

09/60099.1 PCT/EP 99/00478

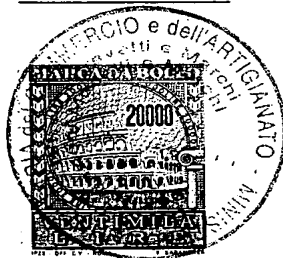


Mod. C.E. 1-47

# MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

EP 99/00478



REC'D 15 JUN 1999

WIPO PCT

5

INV. IND.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per .....

N. MI98 A 000179

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

17 FEB. 1999

Roma, li .....

IL REGENTE

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

.....

*Paolo J. Ciarro*

• H. 98 A. 000. 179

**A. RICHIEDENTE (I)**

[illegible]

### E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome	cognome nome
05 Comoglio Paolo	

**F. PRIORITÀ**

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	Data	N° Protocollo
ITALIA	1	1	1980/01/01			
ITALIA	1	2	1980/01/01			
ITALIA	1	3	1980/01/01			
ITALIA	1	4	1980/01/01			
ITALIA	1	5	1980/01/01			
ITALIA	1	6	1980/01/01			
ITALIA	1	7	1980/01/01			
ITALIA	1	8	1980/01/01			
ITALIA	1	9	1980/01/01			
ITALIA	1	10	1980/01/01			

**FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)**

Minoja Fabrizio

[illegible]

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

M. 98 A 000 779

REG. A

DATA DI DEPOSITO

30/01/1998

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

## A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

## D. TITOLO

"Proteine ricombinanti derivate da HGF e MSP"

Classe proposta (sez. cl. sci.)

(gruppo sottogruppo)

## L. RIASSUNTO

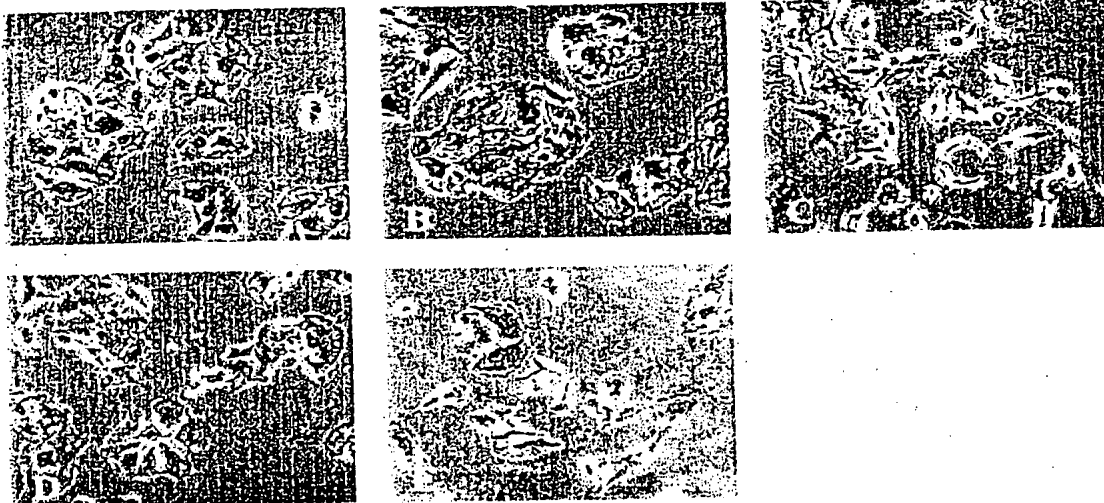
Vengono descritte nuove proteine ricombinanti derivate dal riassortimento di domini strutturali derivati dalle subunità  $\alpha$  dei fattori di crescita HGF e/o MSP.

Le proteine ricombinanti della presente invenzione sono dotate di attività biologica, e proteggono le cellule dalla morte (apoptosi) indotta da farmaci chemioterapici.

Pertanto, queste molecole possono essere convenientemente utilizzate per prevenire o curare gli effetti collaterali tossici del trattamento chemioterapico dei tumori.



FIGURA 6



5354 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

PB/ac "PROTEINE RICOMBINANTI DERIVATE DA HGF E MSP"

a nome : DOMPE' S.p.A.

con sede in: L'Aquila

MI 98 A 0179

\* \* \*

CAMPO DELL'INVENZIONE

30 GEN. 1998

La presente invenzione si riferisce a proteine ricombinanti derivate dalla combinazione di domini strutturali derivati delle subunità  $\alpha$  dei fattori di crescita HGF e MSP.

In particolare, i fattori ingegnerizzati dell'invenzione sono ottenuti per combinazione dei domini HL ("harpin loop") e  $K_1-K_4$  ("kringle") di entrambe le catene  $\alpha$  di HGF e/o MSP, in maniera da ottenere una struttura avente due superdomini con interposta una sequenza "linker". Inoltre, l'invenzione si riferisce a sequenze di DNA che codificano per le suddette proteine ricombinanti, a vettori di espressione comprendenti dette sequenze di DNA e alle cellule ospiti contenenti tali vettori di espressione.

Le proteine ricombinanti della presente invenzione sono dotate di attività biologica, misurabile mediante la determinazione dell'effetto "scattering" (vide infra), e proteggono le cellule dalla morte (apoptosi) indotta da farmaci chemioterapici. Pertanto, queste molecole possono essere convenientemente utilizzate per prevenire o curare gli effetti collaterali tossici del trattamento chemioterapico dei tumori.

rugoso, che indirizza il peptide neosintetizzato alla via secretiva. La catena  $\beta$  contiene un "box" con sequenza omologa a quella tipica di una serina proteasi, ma non possiede nessuna attività enzimatica ("Nakamura, T. et al., 1989, *Nature* 342: 440-443"; "Han, S. et al., 1991, *Biochemistry* 30: 9768-9780"). Sia la catena  $\alpha$  che quella  $\beta$  contribuiscono al legame del fattore di crescita con il rispettivo recettore (Met per HGF e Ron per MSP).

I polipeptidi HGF e MSP sono in grado di indurre una varietà di effetti biologici oltre alla proliferazione cellulare. Le principali attività biologiche di queste molecole sono le seguenti: stimolo della divisione cellulare (mitogenesi); stimolo della motilità ("scattering"); induzione della polarizzazione e del differenziamento cellulare; induzione della formazione di tubuli all'interno di una matrice di collagene (morfogenesi); incremento della sopravvivenza cellulare (protezione da apoptosi). I tessuti che rispondono alla stimolazione con HGF e MSP sono tutti quelli le cui cellule esprimono i rispettivi recettori Met (HGF) e Ron (MSP). I più importanti tessuti bersaglio di questi fattori sono le cellule epiteliali di diversi organi quali il fegato, il rene, il polmone, la mammella, il pancreas e lo stomaco, e alcune cellule del sistema ematopoietico e nervoso. Una descrizione dettagliata degli effetti biologici di HGF e MSP nei vari tessuti si trova in "Tamagnone, L. & Comoglio, P., *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 1997, 8: 129-142, Elsevier Science Ltd."; "Zarnegar, R. & Michalopoulos, G., 1995, *J. Cell Biol.* 129: 1177-1180"; "Medico, E. et al., 1996, *Mol. Biol. Cell*, 7: 495-504"; "Banu, N. et al., 1996, *J.*

mostrato nell'esempio 3. Nel caso dell'MSP, i siti di interazione con il recettore Ron sono meno chiari: alcuni studi preliminari suggeriscono che la situazione sia opposta rispetto a quella dell'HGF, ovvero che sia la catena  $\beta$  a legare direttamente il recettore mentre la catena  $\alpha$  avrebbe la funzione di stabilizzare il complesso ("Wang, M. et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 16999-17004").

L'uso terapeutico di molecole quali HGF e MSP è potenzialmente indicato in una vasta gamma di patologie ("Abdulla, S., 1997, *Mol. Med. Today* 3: 233"). Tuttavia, numerose complicazioni sia di carattere tecnico sia di ordine biologico rendono l'applicazione di queste molecole in campo clinico problematica. Prima di tutto, il carattere pleiotropico di questi fattori può essere causa di risposte biologiche poco selettive e quindi può generare effetti collaterali non desiderabili. Ad esempio, è stato suggerito l'uso di HGF per prevenire alcuni effetti collaterali di farmaci chemioterapici come il cisplatino (Kawaida, K. et al., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:4357-4361). Nei pazienti affetti da cancro trattati con questo farmaco si può verificare un danno renale acuto dovuto all'azione citotossica del cisplatino sulle cellule epiteliali del tubulo prossimale. L'HGF è in grado di proteggere queste cellule dalla morte programmata (apoptosi) indotta dal cisplatino, ma al tempo stesso può indurre la proliferazione indesiderata di cellule neoplastiche. Altri problemi legati all'uso farmaceutico di HGF e MSP sono la necessità di attivazione proteolitica e la stabilità delle molecole, che possono comportare complicazioni di ordine tecnico. Le forme tronche NK1 e NK2 di HGF non presentano i

[A] rappresenta la sequenza  $(LS)_m-HL-K_1-(K_2)_n-(K_3)_O-(K_4)_p$

dove (le numerazioni degli amminoacidi che seguono vanno riferite alle sequenze di HGF e MSP come riportate rispettivamente in Fig. 1 e 2):

LS corrisponde all'intervallo di sequenza amminoacidica 1-31 di HGF o all'intervallo di sequenza 1-18 di MSP;

HL corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di HGF avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 32 e 70, l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 96 e 127; oppure corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di MSP avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 19 e 56, l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 78 e 109;

$K_1$  corrisponde a un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di HGF avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 97 e 128, l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 201 e 205; oppure corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di MSP avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 79 e 110, l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 186 e 190;

$K_2$  corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di HGF avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 202 e 206, l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 283 e 299; oppure corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di MSP avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 187 e 191, l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 268 e 282;

$K_3$  corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di HGF avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 284 e 300,

l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 378 e 385;  
oppure corrisponde a un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di MSP  
avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 268 e 283,  
l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 361 e 369;  
 $K_4$  corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di HGF  
avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 379 e 386,  
l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 464 e 487;  
oppure corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di MSP  
avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 362 e 370;  
l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 448 e 481;  
 $m, n, o, p$  sono scelti tra 0 e 1;

la somma  $n+o+p$  è un numero intero compreso tra (o uguale a) 0 e 3, con  
la condizione che  $n \geq o \geq p$ ;

$B$  è la sequenza  $[(x)_q Y]_r$ , dove  $X = \text{Gly}$  e  $Y = \text{Ser, Cys, Met, Ala}$ ;

$q$  è un numero intero compreso tra (o uguale a) 2 e 8;

$r$  è un numero intero compreso tra (o uguale a) 1 e 9;

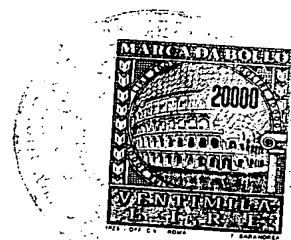
$[C]$  rappresenta la sequenza  $HL-K_1-(K_2)_s-(K_3)_t-(K_4)_u$

dove  $HL, K_1-K_4$  sono come definiti in precedenza,

$s, t, u$  sono scelti tra 0 e 1; la somma  $s + t + u$  è un numero intero  
compreso tra (o uguale a) 0 e 3, con la condizione che  $s \geq t \geq u$ ;

$D$  rappresenta la sequenza  $W-Z$ , dove  $W$  è un sito proteolitico  
convenzionale,  $Z$  una qualsiasi sequenza tracciante (tag) utile per la  
purificazione e rivelazione della proteina;  $y$  è 0 o 1.

Esempi non limitanti di  $W$  sono rappresentati da sequenze di consen-  
so per le proteasi enterochinasi, trombina, fattore  $Xa$  e proteasi  $IgA$ .





Tra le proteine di formula generale (I), sono preferite quelle in cui il dominio HL corrisponde ad una sequenza della catena  $\alpha$  di HGF compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 32 e 127, o ad una sequenza della catena  $\alpha$  di MPS compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 19 e 98; il dominio  $K_1$  corrisponde ad una sequenza della catena  $\alpha$  di HGF compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 128 e 203, o ad una sequenza della catena  $\alpha$  di MPS compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 99 e 188; il dominio  $K_2$  corrisponde ad una sequenza della catena  $\alpha$  di HGF compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 204 e 294, o ad una sequenza della catena  $\alpha$  di MPS compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 189 e 274; il dominio  $K_3$  corrisponde ad una sequenza della catena  $\alpha$  di HGF compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 286 e 383, o ad una sequenza della catena  $\alpha$  di MPS compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 275 e 367; il dominio  $K_4$  corrisponde ad una sequenza della catena  $\alpha$  di HGF compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 384 e 487, o ad una sequenza della catena di MPS compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 368 e 477.

Tra le possibili combinazioni dei domini secondo la formula generale (I), sono preferite le seguenti (II) e (III), relative a due fattori ricombinanti denominati rispettivamente Metron Factor-1 e Magic Factor-1:

$LS_{MSP}-HL_{MSP}-K_1MSP-K_2MSP-L-HL_{HGF}-K_1HGF-K_2HGF-D$  (Metron Factor-1) (II)

e

$LS_{HGF}-HL_{HGF}-K_1HGF-K_2HGF-L-HL_{HGF}-K_1HGF-K_2HGF-D$  (Magic Factor-1) (III)

Per entrambe le molecole, L rappresenta un "linker" di sequenza  $(Gly_4Ser)_3$ , D una sequenza tracciante "tag"  $Asp_4-Lys-His_6$ .

Per il Metron Factor-1, LS<sub>MSP</sub> corrisponde alla sequenza 1-18 di MSP, HL<sub>MSP</sub> alla sequenza 19-56 di MSP, K<sub>1MSP</sub> alla sequenza 99-188 di MSP, K<sub>2MSP</sub> alla sequenza 189-274 di MSP, HL<sub>HGF</sub> alla sequenza 32-127 di HGF, K<sub>1HGF</sub> alla sequenza 128-203 di HGF, K<sub>2HGF</sub> alla sequenza 204-294 di HGF.

Per il Magic Factor-1, HL<sub>HGF</sub>, K<sub>1HGF</sub>, K<sub>2HGF</sub> sono come definiti sopra, LS<sub>HGF</sub> corrisponde alla sequenza 1-31 di HGF.

Le molecole ibride dell'invenzione sono preparate con tecniche di ingegneria genetica secondo una strategia che prevede le seguenti fasi:

- a) costruzione del DNA codificante per la proteina d'interesse;
- b) inserimento del DNA in un vettore d'espressione;
- c) trasformazione di una cellula ospite con il DNA ricombinante (rDNA);
- d) coltura della cellula ospite trasformata in modo da esprimere la proteina ricombinante;
- e) estrazione e purificazione della proteina ricombinante prodotta.

Le sequenze di DNA corrispondenti ai domini strutturali di HGF o di MSP possono essere ottenute per sintesi o a partire dai DNA codificanti per i due fattori naturali. Per esempio, si può operare uno screening di librerie di cDNA utilizzando opportune sonde, in modo da isolare i frammenti di cDNA di HGF o di MSP contenenti i domini che costituiscono la proteina ricombinante, oppure si può utilizzare cDNA ottenuto da mRNA purificato da opportune linee cellulari, per trascrizione inversa, o ancora il cDNA può essere tagliato da plasmidi o, in generale, vettori che contengono le sequenze di HGF o MSP.

I cDNA codificanti per i frammenti delle catene  $\alpha$  di HGF e MSP pos-

sono essere amplificati per PCR ("Mullis, K.B. e Faloona, F.A., Methods in Enzymol. 155 (1987) 335-350"), ed i prodotti di amplificazione ricombinati sfruttando opportuni siti di restrizione, presenti naturalmente nelle sequenze dei fattori oppure introdotti artificialmente nella sequenza degli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione.

In maggior dettaglio, una delle strategie sopra menzionate può essere la seguente:

le porzioni di DNA che codificano per i domini *LS*, *HL*, *K1*, *K2*, *K3* e *K4* vengono amplificate per PCR dai cDNA di HGF o MSP e quindi fatte ricombinare in modo da ottenere le sequenze ibride corrispondenti ad [A] e [C]. Come "*primers*" vengono utilizzate coppie di oligonucleotidi che riconoscono sequenze poste ai due estremi del dominio da amplificare. I "*primers*" vengono disegnati in modo da contenere una sequenza che permetta la ricombinazione fra il DNA di un dominio e quello adiacente. Tale ricombinazione si può effettuare per taglio endonucleasico e successiva reazione ligasica, oppure sfruttando la tecnica della "*recombinant PCR*" ("Innis, NA et al., in *PCR Protocols*, Academic Press, 1990, 177-183").

La sequenza codificante il dominio B ("*linker*") può essere ottenuta mediante la sintesi di un oligonucleotide a doppia catena, che si possa inserire fra [A] e [C] sfruttando opportuni siti di restrizione.

I tre frammenti codificanti per [A], [B] e [C] così ottenuti vengono quindi inseriti nella corretta sequenza in un opportuno vettore. In questa fase si può decidere se aggiungere o meno in coda al frammento [C] il dominio D ("*tag*"), ottenuto per via sintetica analogamente al

dominio B.

Il vettore di espressione ricombinante può contenere, oltre al costrutto ricombinante, un promotore, un sito di legame al ribosoma, un codone di inizio, un codone di terminazione, eventualmente un sito di consenso per intensificatori ("enhancer") di espressione.

Il vettore può comprendere anche un marcatore per la selezione, per isolare le cellule ospiti contenenti il costrutto di DNA. Come vettori possono essere impiegati plasmidi di batteri come Escherichia Coli, di lievito, batteriofagi, virus, retrovirus, oppure può essere utilizzato il DNA come tale.

I vettori vengono clonati preferibilmente in cellule batteriche per esempio in Escherichia coli, come descritto in "Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982", e le colonie possono essere selezionate per esempio per ibridazione con sonde oligonucleotidiche marcate con radioisotopi; successivamente, la sequenza del rDNA estratto dalle colonie positive viene determinata con metodi noti.

Il vettore con il costrutto ricombinante può essere introdotto nella cellula ospite con il metodo della cellula competente [("J. Mol. Biol., 53, 154 (1970)"], il metodo del protoplasto ["PNAS, USA, 75, 1929 (1978)"], il metodo del calcio fosfato ["Science, 221, 551 (1983)"], il metodo DEAE-destrano ["Science, 215, 166 (1983)"], il metodo degli impulsi elettrici ["PNAS, 81, 7161 (1984)"], il metodo del "packaging" in vitro ["PNAS, 72, 581 (1975)"], il metodo del vettore virale ["Cell, 37, 1053 (1984)"], il metodo di micro-iniezione ["Exp. Cell. Res., 153,



347 (1984)"]], ed altri.

Le cellule ospiti possono essere procariote od eucariote, come batteri, lieviti o cellule di mammifero, e saranno tali da produrre efficacemente la proteina ricombinante.

Dopo la trasformazione, le cellule vengono fatte crescere in un appropriato terreno nutritivo, che può essere per esempio MEM, DMEM o RPMI 1640 nel caso le cellule ospiti siano di mammifero.

La proteina ricombinante viene secreta nel terreno di coltura da cui può essere recuperata e purificata con diversi metodi, come la cromatografia a esclusione di massa, d'adsorbimento, d'affinità, con il "salting-out", precipitazione, dialisi, ultrafiltrazione.

Un sistema semplice e rapido per la produzione delle molecole dell'invenzione è per esempio l'espressione transiente in cellule di mammifero.

Il plasmide scelto, per esempio PMT2 ("Sambrook, S. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989"), contenente il frammento di DNA ricombinante viene trasfettato in cellule recipienti appositamente predisposte, come Cos7 ("Sambrook, J. et al., supra") tramite la tecnica del calcio fosfato o altre tecniche equivalenti. Alcuni giorni dopo la trasfezione, il terreno condizionato delle cellule trasfettate viene raccolto, chiarificato per centrifugazione e analizzato il contenuto di fattore. Per questa analisi, si possono utilizzare anticorpi diretti contro HGF o MSP, oppure contro l'eventuale sequenza "tag": il surnatante viene immunoprecipitato e poi analizzato per "western blot" con lo stesso anticorpo. Il surnatante contenente il

fattore ricombinante può anche essere utilizzato direttamente per saggi biochimici e biologici. La proteina può essere purificata ad esempio sfruttando una sequenza "tag" di poli-istidina, tramite adsorbimento su di una colonna di resina al nichel e successiva eluizione con imidazolo.

Le proprietà biochimiche dei fattori ricombinanti dell'invenzione sono state indagate in relazione alla loro capacità di attivare i recettori Met e Ron.

Si è visto che concentrazioni sub-micromolari dei fattori inducono la fosforilazione in tirosina di Met in cellule epiteliali umane A549, mentre in cellule che esprimono Ron non inducono uno stato di fosforilazione al di sopra del basale. Nel complesso, gli esperimenti dimostrano che i primi due "kringle" di HGF mantengono la capacità di interagire ed attivare il recettore tirosin-chinasico Met, mentre i corrispondenti primi due "kringle" di MSP non sono sufficienti per modulare l'attività catalitica del recettore Ron. Tuttavia, l'interazione con Ron, quantunque di bassa affinità, può contribuire al reclutamento del fattore sulla superficie cellulare, svolgendo un ruolo analogo ai recettori a bassa affinità (di natura glicoproteica) che reclutano la molecola intatta di HGF attraverso il dominio che lega l'eparina.

Per quanto riguarda l'attività biologica, le molecole dell'invenzione possiedono una marcata attività biologica, misurata con i test di "scattering", e di protezione delle cellule dall'apoptosi indotta da cisplatino o etoposide.

In particolare, si è visto che il surnatante contenente il fattore

ricombinante promuove lo "scatter" di cellule epiteliali di varia natura fino a concentrazioni nanomolari. In questi saggi sono state usate cellule di epitelio renale (MDCK) o precursori degli epatociti (MLP29).

In un sistema sperimentale in vitro, in cui viene valutata la frammentazione del DNA tipica delle cellule apoptotiche (metodo TUNEL, Gavrieli, Y. et al. (1992), *J. Cell. Biol.* 117, 493-501), i fattori ricombinanti proteggono dall'apoptosi indotta da agenti chemioterapici a livelli comparabili ad HGF e decisamente superiori a MSP. Le molecole ingegnerizzate sono risultate attive sulle cellule epiteliali primarie umane di tubulo prossimale (PTECs), su una linea di PTECs immortalizzata (Loc) e sui già citati epatociti murini MLP29.

Tra le applicazioni delle molecole ricombinanti dell'invenzione, si possono citare:

- prevenzione della mielotossicità; in particolare, possono essere usate per l'espansione di progenitori midollari, per incrementare la proliferazione dei precursori emopoietici o stimolarne la immissione in circolo;
- prevenzione della tossicità epatica, renale e delle mucositi conseguenti a trattamenti antineoplastici; in particolare i fattori ricombinanti possono essere usati per prevenire la tossicità (apoptosi) sugli elementi cellulari differenziati del fegato, del rene e della mucosa del tratto gastroenterico, e per stimolare gli elementi staminali della cute e delle mucose per permettere la rigenerazione degli strati germinativi;
- prevenzione della neurotossicità da chemioterapici.

Nel complesso, si possono citare i seguenti vantaggi legati alle proteine dell'invenzione, rispetto alle molecole parentali HGF e MSP:

- sono molecole più piccole e dalla struttura più compatta;
- sono più stabili e si producono in maggiore quantità;
- non necessitano del taglio endoproteolitico di attivazione, che trasforma i precursori di HGF e MSP nelle rispettive forme attive;
- ingegnerizzando le molecole in combinazioni di domini funzionali diversi, si possono modulare gli effetti biologici, aumentando quelli favorevoli e riducendo quelli indesiderati (per esempio, la protezione da apoptosi verso la proliferazione cellulare).

L'invenzione deve intendersi diretta anche alle sequenze amminoacidiche e nucleotidiche riferite alla formula (I), recanti delle modificazioni, che per esempio possono derivare dalla degenerazione del codice genetico, pertanto senza che la sequenza amminoacidica venga modificata, o dalla delezione, sostituzione, inserzione, inversione o aggiunta di nucleotidi, e/o basi secondo tutti i possibili metodi noti nell'arte.

Inoltre, l'invenzione è estesa ai vettori d'espressione comprendenti una sequenza codificante per una proteina di formula generale (I), che, come detto, possono essere plasmidi, batteriofagi, virus, retrovirus, o altri, e alle cellule ospiti contenenti tali vettori d'espressione.

Infine, l'invenzione è riferita all'uso delle proteine ricombinanti come agenti terapeutici, ed alle composizioni farmaceutiche contenenti





una quantità efficace delle proteine ricombinanti insieme ad eccipienti farmacologicamente accettabili.

#### DESCRIZIONE DELLE FIGURE

(Nella descrizione che segue "-His" posto dopo il nome dei fattori parentali, troncati o ricombinanti, o dei plasmidi, indica che le rispettive sequenze contengono il "tag" di poli-istidina).

Fig. 1:

a) Sequenza nucleotidica e amminoacidica di HGF umano (Gene Bank # M73239; Weidner, K.M., et al., 1991, *Proc. Acad. Sci. USA*, 88:7001-7005). A differenza della referenza citata, nella numerazione qui utilizzata il nucleotide No. 1 è la prima base del codone di inizio (la A del primo ATG). Il primo amminoacido è la corrispondente metionina. Le regioni non tradotte al 5' e al 3' del cDNA non sono né rappresentate, né considerate nella numerazione.

b) Sequenza nucleotidica e amminoacidica di MSP umano (Gene Bank # L11924; Yoshimura, T., et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268:15461-15468). A differenza della referenza citata, nella numerazione utilizzata nel presente documento il nucleotide No. 1 è la prima base del codone di inizio (la A del primo ATG). Il primo amminoacido è la corrispondente metionina. Le regioni non tradotte al 5' e al 3' del cDNA non sono né rappresentate né considerate nella numerazione.

Fig. 2:

a) Struttura molecolare del Metron Factor-1. La leader sequence viene rimossa dalle cellule utilizzate per la produzione prima della secrezione ed è quindi assente dalla molecola matura. Il "tag" di

poliistidina può essere rimosso tramite digestione con la proteasi enterochinasi.

b) Sequenza nucleotidica e amminoacidica del Metron-Factor-1. La sequenza nucleotidica inizia con il sito *EcoRI* e termina con il sito *SalI* (prime sei basi ed ultime sei basi, rispettivamente). Il codone di inizio (ATG) e il codone di terminazione (TAG) sono sottolineati.

Fig. 3:

a) Struttura molecolare del Magic Factor-1. La leader sequence viene rimossa dalle cellule utilizzate per la produzione prima della secrezione ed è quindi assente dalla molecola matura. Il tag di poli-istidina può essere rimosso tramite digestione con la proteasi enterochinasi.

b) Sequenza nucleotidica e amminoacidica del Magic Factor-1. La sequenza nucleotidica inizia con il sito *SalI* (prime sei basi e ultime sei basi, rispettivamente). Il codone di inizio (ATG) e il codone di terminazione (TAG) sono sottolineati.

Fig. 4: Produzione di Metron F-1 per trasfezione transiente in cellule di mammifero. I surnatanti condizionati da cellule BOSC trasfettate con il plasmide di controllo (CTRL) o con pRK7-Metron F-1-His sono stati immunoprecipitati con un anticorpo policlonale anti-MSP e rilevati per "western blot" con lo stesso anticorpo.

Fig. 5: Quantizzazione delle proteine ricombinanti tramite "western blot". (A) Le proteine sono state adsorbite su beads di Sepharose-A-eparina e rivelate con un anticorpo monoclonale anti-poliistidina. (B) Le proteine sono state immunoprecipitate con un anticorpo policlonale anti-MSP e rivelate con un anticorpo monoclonale

anti-poliistidina.

Fig. 6: Saggio di "scattering" compiuto su cellule epiteliali di rene (MDCK) utilizzando le proteine ricombinanti ingegnerizzate prodotte per trasfezione transiente. Il contenuto in proteine è stato quantificato tramite "western blot" (vedi Fig. 5). (A) cellule non stimulate; (B) cellule stimulate con surnatante di controllo; (C) cellule stimulate con HGF-His; (D) cellule stimulate con NK2-HGF-His; (E) cellule stimulate con Metron Factor-1; diluizione dei surnatanti: 1:10.

Fig. 7: Attivazione (fosforilazione) del recettore Met da parte del fattore ibrido Metron Factor-1. Cellule epiteliali umane (A549) sono state stimulate con i surnatanti condizionati da cellule BOSC trasfettate con il plasmide di controllo (CTRL) o con pRK7-Metron\_F-1-His (METRON F-1) alle diluizioni indicate. I lisati cellulari delle cellule stimulate sono stati immunoprecipitati con un anticorpo monoclonale anti-Met e rivelati per "western blot" con un anticorpo monoclonale anti-fosfotirosina.

Gli esempi di seguito riportati illustrano in maggior dettaglio l'invenzione.

#### Esempio 1a

##### Ottenimento del costrutto ricombinante codificante per il Metron Factor-1

Il cDNA di HGF è stato ottenuto con la tecnica di RT-PCR ("Reverse Transcriptase PCR; in: Innis, M. A., et al., PCR Protocols, Academic Press, 1990, 21-27") da una linea cellulare di fibroblasti di polmone

umano (MRC5; "Naldini, L. et al., 1991, EMBO J. 10: 2867-2878"). Il cDNA di MSP è stato ottenuto con la stessa tecnica da fegato umano ("Gaudino, G., et al., 1994, EMBO J. 13: 3524-3532").

Il frammento corrispondente a LS-HL-K1-K2 di MSP è stato amplificato per PCR utilizzando il cDNA di MSP come "template" e i seguenti oligonucleotidi come "primers":

P1 (senso)

5' CGCGCGGAATTCCACCATGGGGTGGCTCCCACTCCT 3'

P2 (antisenso)

5' CGCGCGCTCGAGGCGGGGCTGTGCCTCGGACCCGCA 3'

in cui le sequenze palindromi sottolineate rappresentano i siti di restrizione per gli enzimi *EcoRI* (oligonucleotide P1) e *XhoI* (oligonucleotide P2). Il prodotto di PCR è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *XhoI* e quindi purificato tramite elettroforesi su gel di agarosio.

Il frammento corrispondente a HL-K1-K2 di HGF è stato amplificato per PCR utilizzando il cDNA di HGF come "template" e i seguenti oligonucleotidi come "primers":

P3 (senso)

5' CGCGCGTCTAGAGGGACAAAGGAAAAGAAGAAATAC 3'

P4 (antisenso)

5' CGCGCGAAGCTTTGTCAGCGCATGTTTAAATTGCAC 3'

in cui le sequenze palindromi sottolineate rappresentano i siti di restrizione per gli enzimi *XbaI* (oligonucleotide P3) e *HindIII* (oligonucleotide P4). Il prodotto di PCR è stato digerito con gli enzimi



di restrizione *XbaI* e *HindIII* e quindi purificato tramite elettroforesi su gel di agarosio.

Per la sequenza corrispondente al "linker", sono stati sintetizzati i seguenti oligonucleotidi parzialmente complementari, che sono stati in seguito fatti appaiare per ottenere un frammento di DNA a doppia elica con estremità coesive:

*P5 (senso)*

5' TCGAGGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGCGGTTCT 3'

*P6 (antisenso)*

5' CTAGAGAACCGCCACCGCCGGAGCCACCGCCACCAGAACCGCCACCGCCC 3'

in cui le basi sottolineate rappresentano le sequenze compatibili con i siti di restrizione per gli enzimi *XhoI* (oligonucleotide P5) e *XbaI* (oligonucleotide P6).

I tre frammenti di DNA così ottenuti sono stati subclonati nell'ordine appropriato nei siti *EcoRI-HindIII* del vettore di espressione pRK7 ("Gaudino, G., et al., 1994, *EMBO J.* 13: 3524-3532"), ottenendo il plasmide ricombinante pRK7-Metron\_F1, contenente tutti i componenti del Metron Factor-1 esclusa la sequenza tracciante.

Per l'inserimento di questa sequenza, sono stati sintetizzati i seguenti oligonucleotidi parzialmente complementari, che sono stati in seguito fatti appaiare per ottenere un frammento di DNA a doppia elica con estremità coesive:

*P7 (senso)*

5' AGCTGACGACGACGACAAACACCACCACCACCACCACCACTAGG|GTCGAC| 3'

*P8 (antisenso)*

Bianchetti Bracco Minoja  
Bianchetti Giuseppe ed altri

s.r.l.

### Esempio 1b

Produzione del Metron Factor-1

Il vettore d'espressione pRK7 contiene un promotore del gene "immediate-early" del citomegalovirus umano (CMV) e un sito di origine di replicazione episomale del virus a DNA SV40. Pertanto, questo plasmide si presta particolarmente per l'espressione di proteine in cellule che esprimono il "large T antigen" del virus SV40, come le cellule di epitelio renale BOSC ("Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989"). Il Metron Factor-1 può essere quindi prodotto tramite trasfezione transiente del plasmide pRK7-Metron F1-His in cellule BOSC.

Per la trasfezione,  $10^6$  cellule per piastra da 100 mm di diametro vengono seminate al giorno 0 in 90% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-10% siero fetale bovino (10 ml/piastra). Il giorno 1, le cellule vengono trasfettate con 10  $\mu$ g/piastra di pRK7-Metron\_F1-His tramite lipofezione, utilizzando il protocollo fornito dalla ditta produttrice di lipofectina (Gibco-BRL). Il giorno 2, il medium contenente il DNA

viene sostituito con medium fresco a basso contenuto di siero (99.5% DMEM-0.5% siero fetale bovino). Il giorno 4 (48 ore dopo la fine della trasfezione), il medium viene prelevato, chiarificato per centrifugazione, e analizzato per il suo contenuto in Metron Factor-1.

Questa analisi può essere compiuta in modi diversi. Ad esempio, la proteina ricombinante presente nel surnatante chiarificato può essere immunoprecipitata con un anticorpo anti-MSP e poi visualizzata tramite "western blot" con lo stesso anticorpo (Fig. 4). Nell'esempio mostrato nella figura 4, 500 µl di surnatante (chiarificato per centrifugazione, tamponato in 25 mM HEPES e addizionato di *cocktail* di inibitori delle proteasi) sono stati immunoprecipitati (2 ore a 4° C) con 20 µl di "beads" di Sepharose-A (Pharmacia) coniugate covalentemente con 2 µl di siero di coniglio immunizzato contro la porzione N-terminale di MSP. Il "pellet" di "beads" è stato lavato 3 volte con 500 µl di tampone di lavaggio (20 mM HEPES pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.1% Triton X-100; 10% glicerolo) e scaldato per 2 minuti a 90° C in 100 µl di tampone di Laemmli. Le proteine così eluite sono state separate per SDS-PAGE su un gel all'8% di BIS-acrilamide, trasferite su membrana (Hybond-C; Amersham) e analizzate tramite *western blot*. Per questa analisi, come anticorpo primario è stato usato lo stesso siero di coniglio impiegato per l'immunoprecipitazione con diluizione 1:1000 e come anticorpo secondario proteina A coniugata con la perossidasi (Amersham). La proteina A è stata evidenziata tramite ECL (Amersham) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

Alternativamente, la proteina ricombinante può essere

parzialmente purificata tramite adsorbimento su "beads" di Sepharose-A coniugate con eparina e successiva analisi per "western blot" utilizzando anticorpi diretti contro il "tag" di poliistidina (Fig. 5).

Nell'esempio mostrato nella figura 5, le "beads" (20 µl) di Sepharose-A-eparina (Pierce) sono state incubate (4 ore a 4° C) con 500 µl di surnatante (chiarificato per centrifugazione, tamponato in 25 mM HEPES e addizionato di *cocktail* di inibitori delle proteasi) in presenza di 500 mM NaCl, lavate con tampone apposito (500 mM NaCl; 20 mM HEPES pH 7.4; 0.1% Triton X-100; 10% glicerolo) e scaldate per 2 minuti a 90° C in 100 µl di tampone di *Laemmli*. Le proteine così eluite sono state separate per SDS-PAGE su un gel all'8% di bis-acrilamide, trasferite su membrana (Hybond-C; Amersham) e analizzate tramite "western blot". Per questa analisi, come anticorpo primario è stato usato un anticorpo monoclonale di topo contro la poliistidina (Invitrogen) diluito 1:5000 e come anticorpo secondario un anticorpo ovino anti-IgG di topo coniugato con la perossidasi (Amersham). L'anticorpo secondario è stato evidenziato tramite ECL (Amersham) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

La procedura di adsorbimento su *beads* di eparina può essere utilizzata anche come protocollo di semi-purificazione della proteina ricombinante. In aggiunta, la molecola può essere additionally purificata sfruttando l'affinità della poliistidina per i metalli pesanti quali il nichel. La proteina contenente il "tag" di poliistidina può essere adsorbita su di una colonna di resina al nichel (Invitrogen)





e successivamente eluita con imidazolo (il protocollo dettagliato è fornito dalla ditta produttrice).

#### Esempio 2a

##### Ottenimento del costrutto ricombinante codificante per il Magic

##### Factor-1

Come DNA di partenza sono stati utilizzati il cDNA di HGF e il plasmide pRK7-Metron\_F1-His descritto in precedenza.

Il frammento corrispondente a LS-HL-K1-K2 di HGF è stato amplificato per PCR utilizzando il cDNA di HGF come *template* e i seguenti oligonucleotidi come *primers*:

P9 (*senso*)

5' CGCGCGGGATCCGCCAGCCCGTCCAGCAGCACCATG 3'

P10 (*antisenso*)

5' CGCGCGAAGCTTTGTCAGCGCATGTTTAAATTGCAC 3'

in cui le sequenze palindromi sottolineate rappresentano i siti di restrizione per gli enzimi *Bam*HI (oligonucleotide P9) e *Hind*III (oligonucleotide P10). Il prodotto di PCR è stato digerito con gli enzimi di restrizione *Bam*HI e *Hind*III e quindi purificato tramite elettroforesi su gel di agarosio.

Per la sequenza corrispondente al "linker", sono stati sintetizzati i seguenti oligonucleotidi parzialmente complementari, che sono stati in seguito fatti appaiare per ottenere un frammento di DNA a doppia elica con estremità coesive:

P11 (*senso*)

5' AGCTTCGGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGCGGTTCT 3'

P12 (antisense)

5' CTAGAGAACCGCCACCGCCGGAGCCACCGCCACCAGAACCGCCACCGCCCGA 3'

in cui le basi sottolineate rappresentano le sequenze compatibili con i siti di restrizione per gli enzimi *HindIII* (oligonucleotide P11) e *XbaI* (oligonucleotide P12).

Il frammento così ottenuto per PCR e la sequenza "linker" a doppia elica sono stati inseriti nel plasmide pRK7-Metron\_F1-His al posto del frammento *EcoRI-XbaI* tramite un adattatore *EcoRI-BamHI*, ottenendo il plasmide pRK7-Magic\_F1-His.

#### Esempio 2b

##### Produzione del Magic Factor-1

Il Magic Factor-1 viene prodotto in piccola scala per trasfezione transiente in cellule BOSC analogamente a quanto descritto per il Metron Factor-1. Per la semi-purificazione e rivelazione con anticorpi, viene adottata la tecnica di adsorbimento su "beads" di Sepharose-A coniugate con eparina e successiva analisi per "western blot" utilizzando anticorpi diretti contro il "tag" di poliistidina (Fig. 5).

#### Esempio 3

##### Attività biologica ("scattering") su cellule epiteliali.

E' stato fatto un saggio motogenico (scattering) su cellule epiteliali di rene MDCK ad opera dei fattori HGF, NK2-HGF e Metron Factor-1. Per questo saggio funzionale, le cellule vengono piastrate al giorno 0 in piastre da 96 pozzetti ( $10^3$  cellule/pozzetto) in 90% DMEM - 10% siero fetale bovino. Il giorno 1 il medium viene sostituito con terreno fresco tamponato con 50mM HEPES pH 7.4 e il surnatante

contenente la proteina ricombinante viene addizionato alle diverse diluizioni. Il giorno 2 le cellule vengono lavate con DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), fissate in 11% glutaraldeide, colorate con una soluzione di cristal-violetto e analizzate tramite microscopia. L'attività di "scatter" viene valutata osservando la morfologia delle colonie, che appaiono raggruppate nel controllo negativo (cellule non stimulate o stimulate con surnatante non contenente nessun fattore) e disperse nel controllo positivo (HGF-His). Anche la morfologia delle cellule stesse varia in seguito a stimolazione: infatti, come si può osservare nella Fig. 6, le cellule stimulate con HGF-His e Metron Factor-1 assumono una forma più allungata e fusiforme, caratterizzata da protuberanze della membrana cellulare denominate pseudopodi. Queste variazioni morfologiche sono la conseguenza dell'attivazione da parte dei fattori di un programma genetico che prevede la modificazione di una serie di parametri cellulari, quali la digestione della matrice cellulare da parte di proteasi specifiche e l'aumento della motilità.

La tabella 1 riassume i risultati di diversi esperimenti ottenuti con i fattori HGF-His, NK2-HGF-His e Metron Factor-1 sulle cellule MDCK. Le unità di "scatter" riportate indicano la diluizione massima del surnatante condizionato contenente il fattore, fino alla quale è possibile osservare attività motogenica. I valori sono normalizzati per il contenuto di proteina determinato per "western blotting" come descritto sopra (vedi Fig. 5). Questi dati indicano che il fattore ibrido Metron Factor-1 possiede un'attività di "scatter" approssimativamente tre ordini di grandezza superiore a quella della

forma tronca NK2-HGF-His e un ordine di grandezza superiore a quella del fattore parentale HGF-His.

Tabella 1

HGF-His	NK2-HGF-His	Metron F-1
unità scatter $900 \pm 29$	$6 \pm 5$	$5500 \pm 1532$



Tabella 1: attività di "scatter" dei fattori HGF-His, NK2-HGF-His Metron Factor-1 misurata in cellule epiteliali di rene (MDCK). Le unità di "scatter" riportate indicano la diluizione massima del surnatante condizionato contenente il fattore, fino alla quale è possibile osservare attività motogenica. I valori sono normalizzati per il contenuto di proteina determinato per "western blotting".

#### Esempio 4

##### Saggio per la valutazione della protezione dalla morte cellulare programmata (apoptosi).

E' stato messo a punto un saggio funzionale *in vitro* che permette di valutare la percentuale di cellule apoptotiche trattate con cisplatino in presenza o assenza di un fattore di sopravvivenza.

Tale sistema si avvale di una linea cellulare derivata da cellule epiteliali di tubulo prossimale di rene umano (LOC), immortalizzate attraverso l'espressione ectopica del "large T antigen" del virus a DNA SV40. Per il saggio funzionale, le cellule vengono piastrate al giorno 0 in piastre da 96 pozzetti ( $10^3$  cellule/pozzetto) in 90% DMEM - 10% siero fetale bovino. Il giorno 1, il terreno viene sostituito con un medium contenente 0.5% siero

fetale bovino tamponato con 50mM HEPES pH 7.4, a cui vengono aggiunte diverse diluizioni del surnatante contenente il fattore ricombinante. Le cellule vengono pre-incubate con questi fattori per 6 ore, e quindi incubate ulteriormente in presenza di 10µg/ml cisplatino. Il giorno 2, le cellule vengono lavate con DPBS e la percentuale di cellule apoptotiche viene valutata tramite la tecnica TUNEL (Boheringer Mannheim). Lo stesso tipo di saggio può essere svolto utilizzando colture primarie di cellule epiteliali umane di tubulo prossimale del rene (PTEC).

Questi esperimenti hanno permesso di determinare che il Metron Factor-1 possiede attività di protezione da morte cellulare programmata indotta da cisplatino.

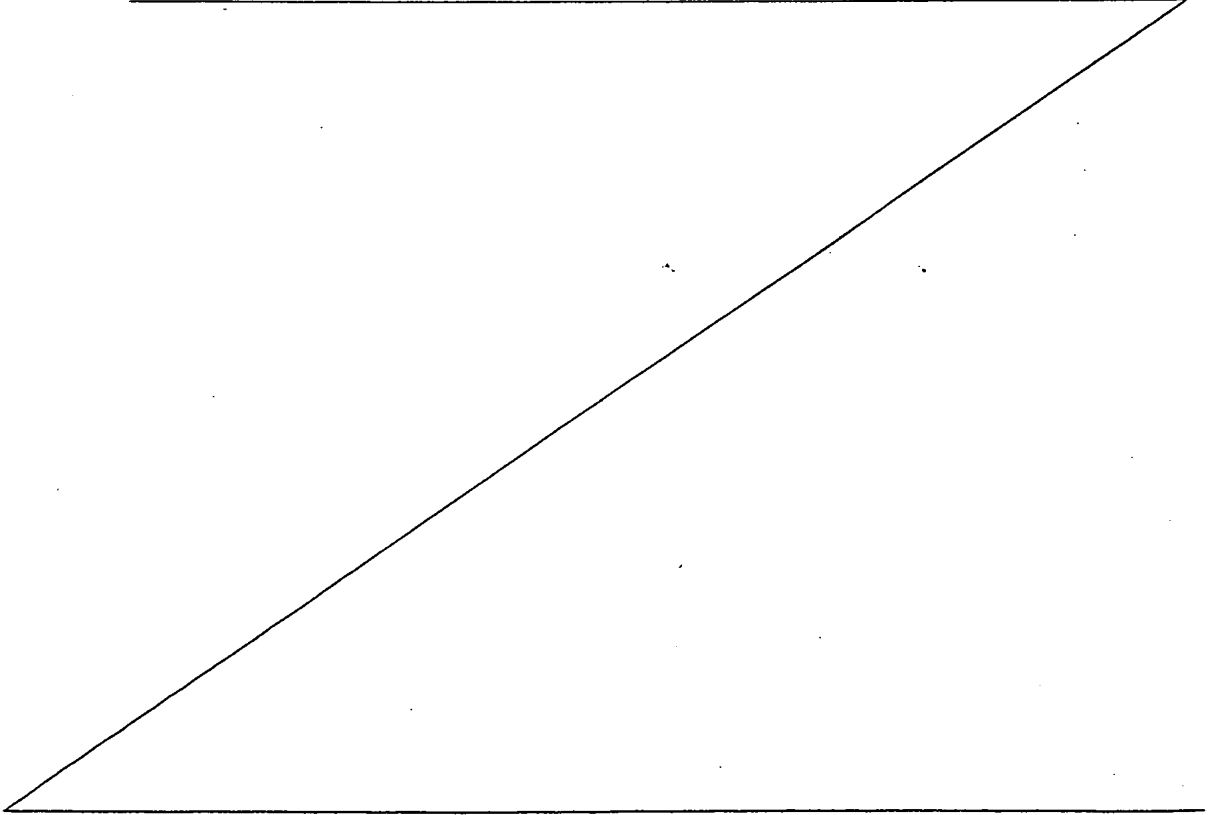
#### Esempio 5

##### Induzione della fosforilazione in tirosina da parte del fattore ibrido Metron Factor-1.

E' stata analizzata l'abilità del Metron Factor-1 di indurre la fosforilazione in tirosina del recettore Met in cellule epiteliali umane (A549).

Per questa analisi, una coltura al 90% della confluenza di cellule A549 in una petri da 100 mm di diametro è stata stimolata per 10 minuti con 1 ml di surnatante condizionato contenente il fattore Metron Factor-1 o nessun fattore (come controllo negativo) diluito 1:2.5 o 1:10 in DMEM. Dopo la stimolazione, le cellule sono state lavate in ghiaccio con PBS, lisate in 200 µl di soluzione di lisi (1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4) addizionata di un cocktail di

inibitori delle proteasi, immunoprecipitate per 2 ore a 4° C con 10 µl di beads di Sepharose-A coniugate covalentemente con un anticorpo monoclonale anti-Met ("Naldini, L. et al., 1991, *EMBO J.* 10: 2867-2878"), lavate 3 volte nella stessa soluzione di lisi, e scaldate a 90° C per 2 minuti per eluire le proteine adsorbite. Queste ultime sono state separate per SDS-PAGE su un gel all'8% di BIS-acrilamide, trasferite su membrana (Hybond-C; Amersham) e analizzate tramite "western blot". Per questa analisi, come anticorpo primario è stato usato un anticorpo monoclonale di topo contro la fosfotirosina (UBI) diluito 1:10000 e come anticorpo secondario un anticorpo ovino anti-IgG di topo coniugato con la perossidasi (Amersham). L'anticorpo secondario è stato evidenziato tramite ECL (Amersham) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. La Fig. 7 mostra i risultati di questa analisi.



# RIVENDICAZIONI

1. Proteine ricombinanti caratterizzate dal fatto che la loro struttura comprende due superdominii, costituiti dalla combinazione dei domini HL e K<sub>1</sub>-K<sub>4</sub> delle catene α di HGF e MSP, separati da una sequenza separatrice di legame ("linker").

2. Proteine ricombinanti secondo la rivendicazione 1, di formula generale (I):

$$[A] - B - [C] - (D)_Y \quad (I)$$

in cui

[A] rappresenta la sequenza (LS)<sub>m</sub>-HL-K<sub>1</sub>-(K<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-(K<sub>3</sub>)<sub>o</sub>-(K<sub>4</sub>)<sub>p</sub>

dove (le numerazioni degli amminoacidi che seguono vanno riferite alle sequenze di HGF e MSP come riportate rispettivamente in Fig. 1 e 2):

LS corrisponde all'intervallo di sequenza amminoacidica 1-31 di HGF o all'intervallo di sequenza 1-18 di MSP;

HL corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità α di HGF avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 32 e 70, l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 96 e 127; oppure corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità α di MSP avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 19 e 56, l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 78 e 109;

K<sub>1</sub> corrisponde a un intervallo di sequenza della subunità α di HGF avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 97 e 128, l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 201 e 205; oppure corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità α di MSP avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 79 e 110,

l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 186 e 190;

$K_2$  corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di HGF

avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 202 e 206,

l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 283 e 299;

oppure corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di MSP

avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 187 e 191,

l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 268 e 282;

$K_3$  corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di HGF

avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 284 e 300,

l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 378 e 385;

oppure corrisponde a un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di MSP

avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 268 e 283,

l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 361 e 369;

$K_4$  corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di HGF

avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 379 e 386,

l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 464 e 487;

oppure corrisponde ad un intervallo di sequenza della subunità  $\alpha$  di MSP

avente un estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 362 e 370;

l'altro estremo compreso tra (o uguale a) gli amminoacidi 448 e 481;

$m, n, o, p$  sono scelti tra 0 e 1;

la somma  $n+o+p$  è un numero intero compreso tra (o uguale a) 0 e 3, con

la condizione che  $n \geq o \geq p$ ;

$B$  è la sequenza  $[(x)_q Y]_r$ , dove  $X = \text{Gly}$  e  $Y = \text{Ser, Cys, Met, Ala}$ ;

$q$  è un numero intero compreso tra (o uguale a) 2 e 8;

$r$  è un numero intero compreso tra (o uguale a) 1 e 9;





[C] rappresenta la sequenza  $HL-K_1-(K_2)_s-(K_3)_t-(K_4)_u$

dove  $HL, K_1-K_4$  sono come definiti in precedenza,

$s, t, u$  sono scelti tra 0 e 1; la somma  $n + o + p$  è un numero intero

compreso tra (o uguali a) 0 e 3, con la condizione che  $s \geq t \geq u$ ;

D rappresenta la sequenza W-Z, dove W è un sito proteolitico convenzionale, Z una qualsiasi sequenza utile per la purificazione della proteina su colonne di nichel o d'affinità; y può essere 0 o 1.

3. Proteine ricombinanti secondo le rivendicazioni 1-2, in cui il dominio HL corrisponde ad una sequenza della catena  $\alpha$  di HGF compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 32 e 127, o ad una sequenza della catena  $\alpha$  di MPS compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 19 e 98; il dominio  $K_1$  corrisponde ad una sequenza della catena  $\alpha$  di HGF compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 128 e 203, o ad una sequenza della catena  $\alpha$  di MPS compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 99 e 188; il dominio  $K_2$  corrisponde ad una sequenza della catena  $\alpha$  di HGF compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 204 e 294, o ad una sequenza della catena  $\alpha$  di MPS compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 189 e 274; il dominio  $K_3$  corrisponde ad una sequenza della catena  $\alpha$  di HGF compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 286 e 383, o ad una sequenza della catena  $\alpha$  di MPS compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 275 e 367; il dominio  $K_4$  corrisponde ad una sequenza della catena  $\alpha$  di HGF compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 384 e 487, o ad una sequenza della catena di MPS compresa tra (o uguale a) gli amminoacidi 368 e 477.

4. Proteine ricombinanti secondo le rivendicazioni 1-3 di formula (II):

$LS_{MSP}-HL_{MSP}-K_1_{MSP}-K_2_{MSP}-L-HL_{HGF}-K_1_{HGF}-K_2_{HGF}-D$  (Metron Factor-1) (II)

in cui  $LS_{MSP}$  corrisponde alla sequenza 1-18 di MSP,  $HL_{MSP}$  alla sequenza 19-56 di MSP,  $K_{1MSP}$  alla sequenza 99-188 di MSP,  $K_{2MSP}$  alla sequenza 189-274 di MSP,  $HL_{HGF}$  alla sequenza 32-127 di HGF,  $K_{1HGF}$  alla sequenza 128-203 di HGF,  $K_{2HGF}$  alla sequenza 204-294 di HGF,  $L$  è la sequenza  $(Gly_4Ser)_3$ ,  $D$  è la sequenza  $Asp_4-Lys-His_6$ .

5. Proteine ricombinanti secondo le rivendicazioni 1-3 di formula (III):

$LS_{HGF}-HL_{HGF}-K_{1HGF}-K_{2HGF}-L-HL_{HGF}-K_{1HGF}-K_{2HGF}-D$  (Magic Factor-1) (III)

in cui  $HL_{HGF}$ ,  $K_{1HGF}$ ,  $K_{2HGF}$ ,  $L$  e  $D$  sono come definiti nella rivendicazione 4,  $LS_{HGF}$  corrisponde alla sequenza 1-31 di HGF.

6. Sequenza nucleotidica codificante per le proteine ricombinanti delle rivendicazioni 1-5.

7. Vettori di espressione comprendenti le sequenze nucleotidiche della rivendicazione 6.

8. Cellula ospite eucariota o procariota contenente un vettore d'espressione della rivendicazione 7.

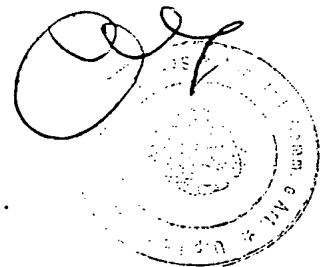
9. Uso delle proteine ricombinanti delle rivendicazioni 1-5 come agenti terapeutici.

10. Composizioni farmaceutiche contenenti una quantità efficace delle proteine ricombinanti delle rivendicazioni 1-5, insieme ad eccipienti farmacologicamente accettabili.

Milano, 30 gennaio 1998

Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti · Bracco · Minoja S.r.l.

*Fabrizio Minoja*



M 26.05.99

FIGURA 1a

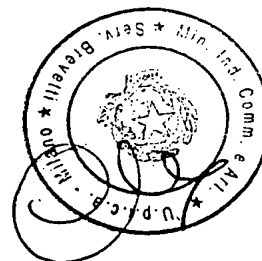
MI 98 A 0179

1 ATGTGGGTGACCAAACCTCCTGCCAGCCCTGCTGCTGCAGCATGTCCTCCTGCATCTCCTC 60  
TACACCCACTGGTTTGAGGACGGTCGGGACGACGACGTCGTACAGGAGGACGTAGAGGAG  
1 M W V T K L L P A L L L Q H V L L H L L 20  
CTGCTCCCCATCGCCATCCCCTATGCAGAGGGACAAAGGAAAAGAAGAAATACAATTCAT 120  
GACGAGGGGTAGCGGTAGGGGATACGTCTCCCTGTTTCCTTTTCTTTTATGTTAAGTA  
21 L L P I A I P Y A E G Q R K R R N T I H 40  
GAATTCAAAAAATCAGCAAAGACTACCCCTAATCAAAATAGATCCAGCACTGAAGATAAAA 180  
CTTAAGTTTTTTAGTCGTTTCTGATGGGATTAGTTTTATCTAGGTCGTGACTTCTATTTT  
41 E F K K S A K T T L I K I D P A L K I K 60  
ACCAAAAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCTAATAGATGTACTAGGAATAAAGGACTT 240  
TGGTTTTTTTCACTTATGACGTCTGGTTACACGATTATCTACATGATCCTTATTTCTGAA  
61 T K K V N T A D Q C A N R C T R N K G L 80  
CCATTCACTTGCAAGGCTTTTGTGTTTGGATAAAGCAAGAAAACAATGCCTCTGGTTCCCC 300  
GGTAAGTGAACGTTCCGAAAACAAAACCTATTTCGTTCTTTTGTGTTACGGAGACCAAGGGG  
81 P F T C K A F V F D K A R K Q C L W F P 100  
TTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAAGAATTTGGCCATGAATTTGACCTCTATGAA 360  
AAGTTATCGTACAGTTCACCTCACTTTTTTCTTAAACCGGTACTTAACTGGAGATACTT  
101 F N S M S S G V K K E F G H E F D L Y E 120  
AACAAAGACTACATTAGAACTGCATCATTGGTAAAGGACGCAGCTACAAGGGAACAGTA 420  
TTGTTTCTGATGTAATCTTTGACGTAGTAACCATTTCTGCGTCGATGTTCCCTTGTCAT  
121 N K D Y I R N C I I G K G R S Y K G T V 140  
TCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGCCCTGGAGTTCCATGATACCACACGAACAC 480  
AGATAGTGATTCTCACCGTAGTTTACAGTCGGGACCTCAAGGTACTATGGTGTGCTTGTC  
141 S I T K S G I K C Q P W S S M I P H E H 160

(continua)

Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti - Bracco - Minoja s.r.l.

*F. Minoja*



(Fig. 1a continua)

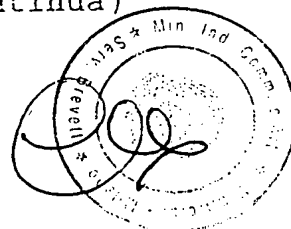
M. 98 A. 01.7.9

481 AGCTATCGGGGTAAAGACCTACAGGAAACTACTGTCTGAAATCCTCGAGGGGAAGAAGGG 540  
TCGATAGCCCCATTTCTGGATGTCTTTTGATGACAGCTTTAGGAGCTCCCTTCTTCCC  
161 S Y R G K D L Q E N Y C R N P R G E E G 180  
GGACCCTGGTGTTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGAAGTCTGTGACATTCCTCAG  
541 CCTGGGACCACAAAGTGTTTCGTTAGGTCTCCATGCGATGCTTCAGACACTGTAAGGAGTC 600  
181 G P W C F T S N P E V R Y E V C D I P Q 200  
TGTTTCAGAAGTTGAATGCATGACCTGCAATGGGGAGAGTTATCGAGGTCTCATGGATCAT  
601 ACAAGTCTTCAACTTACGTACTGGACGTTACCCCTCTCAATAGCTCCAGAGTACCTAGTA 660  
201 C S E V E C M T C N G E S Y R G L M D H 220  
ACAGAATCAGGCAAGATTTGTCTAGCGCTGGGATCATCAGACACCACACCGGCACAAATTC  
661 TGTCTTAGTCCGTTCTAAACAGTCGCGACCCCTAGTAGTCTGTGGTGTGGCCGTGTTAAG 720  
221 T E S G K I C Q R W D H Q T P H R H K F 240  
TTGCCTGAAAGATATCCCGACAAGGGCTTTGATGATAATTATTGCCGCAATCCCGATGGC  
721 AACGGACTTTCTATAGGGCTGTTCCCGAAACTACTATTAATAACGGCGTTAGGGCTACCG 780  
241 L P E R Y P D K G F D D N Y C R N P D G 260  
CAGCCGAGGCCATGGTGCTATACTCTTGACCCTCACACCCGCTGGGAGTACTGTGCAATT  
781 GTCGGCTCCGGTACCACGATATGAGAACTGGGAGTGTGGGCGACCCCTCATGACACGTAA 840  
261 Q P R P W C Y T L D P H T R W E Y C A I 280  
AAAACATGCGCTGACAATACTATGAATGACACTGATGTTCTTTGGAAACAACCTGAATGC  
841 TTTTGTACGCGACTGTTATGATACTTACTGTGACTACAAGGAAACCTTTGTTGACTTACG 900  
281 K T C A D N T M N D T D V P L E T T E C 300  
ATCCAAGGTCAAGGAGAAGGCTACAGGGGCACTGTCAATACCATTTGGAATGGAATTCCA  
901 TAGGTTCCAGTTCCTCTTCCGATGTCCCGTGACAGTTATGGTAAACCTTACCTTAAGGT 960  
301 I Q G Q G E G Y R G T V N T I W N G I P 320  
TGTCAGCGTTGGGATTCTCAGTATCCTCAGGAGCATGACATGACTCCTGAAAATTTCAAG  
961 ACAGTCGCAACCTAAGAGTCATAGGAGTGCTCGTACTGTACTGAGGACTTTTAAAGTTC 1020  
321 C Q R W D S Q Y P H E H D M T P E N F K 340  
TGCAAGGACCTACGAGAAAATTACTGCCGAAATCCAGATGGGTCTGAATCACCTGGTGT  
1021 ACGTTCCTGGATGCTCTTTAATGACGGCTTTAGGTCTACCCAGACTTAGTGGGACCACA 1080  
341 C K D L R E N Y C R N P D G S E S P W C 360  
TTTACCACTGATCCAAACATCCGAGTTGGCTACTGCTCCCAAATTCCAACTGTGATATG  
1081 AAATGGTGACTAGGTTTGTAGGCTCAACCGATGACGAGGGTTTAAAGGTTTGACACTATAC 1140  
361 F T T D P N I R V G Y C S Q I P N C D M 380

Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti · Bracco · Minoja s.r.l.

*Fabrizio*

(continua)

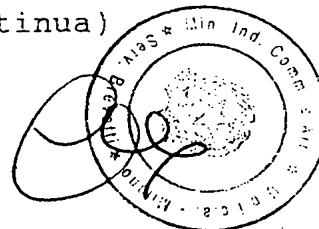


(Fig. 1a continua)

1141 TCACATGGACAAGATTGTTATCGTGGGAATGGCAAAAATTATATGGGCAACTTATCCCAA 1200  
 AGTGTACCTGTTCTAACAAATAGCACCTTACCGTTTTTAATATACCCGTTGAATAGGGTT  
 381 S H G Q D C Y R G N G K N Y M G N L S Q 400  
 1201 ACAAGATCTGGACTAACATGTTCAATGTGGGACAAGAACATGGAAGACTTACATCGTCAT 1260  
 TGTCTAGACCTGATTGTACAAGTTACACCCTGTTCTTGTACCTTCTGAATGTAGCAGTA  
 401 T R S G L T C S M W D K N M E D L H R H 420  
 1261 ATCTTCTGGGAACCAGATGCAAGTAAGCTGAATGAGAATTACTGCCGAAATCCAGATGAT 1320  
 TAGAAGACCCCTTGGTCTACGTTTACGACTTACTCTTAATGACGGCTTTAGGTCTACTA  
 421 I F W E P D A S K L N E N Y C R N P D D 440  
 1321 GACGCTCATGGACCCTGGTGCTACACGGGAAATCCACTCATTCCCTTGGGATTATTGCCCT 1380  
 CTGCGAGTACCTGGGACCACGATGTGCCCTTTAGGTGAGTAAGGAACCCTAATAACGGGA  
 441 D A H G P W C Y T G N P L I P W D Y C P 460  
 1381 ATTTCTCGTTGTGAAGGTGATACCACACCTACAATAGTCAATTTAGACCATCCCCTAATA 1440  
 TAAAGAGCAACACTTCCACTATGGTGTGGATGTTATCAGTTAAATCTGGTAGGGCATTAT  
 461 I S R C E G D T T P T I V N L D H P V I 480  
 1441 TCTTGTGCCAAAACGAAACAATTGCGAGTTGTAAATGGGATTCCAACACGAACAAACATA 1500  
 AGAACACGGTTTTGCTTTGTAAACGCTCAACATTTACCCTAAGGTTGTGCTTGTGTTGTAT  
 481 S C A K T K Q L R V V N G I P T R T N I 500  
 1501 GGATGGATGGTTAGTTTGTAGATACAGAAATAAACATATCTGCGGAGGATCATTGATAAAG 1560  
 CCTACCTACCAATCAAACCTATGTCTTTATTTGTATAGACGCCTCCTAGTAACTATTTT  
 501 G W M V S L R Y R N K H I C G G S L I K 520  
 1561 GAGAGTTGGGTTCTTACTGCACGACAGTGTTCCTTCTCGAGACTTGAAAGATTATGAA 1620  
 CTCTCAACCCAAGAATGACGTGCTGTACAAAGGGAAGAGCTCTGAACCTTTCTAATACTT  
 521 E S W V L T A R Q C F P S R D L K D Y E 540  
 1621 GCTTGGCTTGAATTCATGATGTCCACGGAAGAGGAGATGAGAAATGCAAACAGGTTCTC 1680  
 CGAACCGAACCTTAAGTACTACAGGTGCCTTCTCCTCTACTCTTTACGTTTGTCCAAGAG  
 541 A W L G I H D V H G R G D E K C K Q V L 560  
 1681 AATGTTTCCCAGCTGGTATATGGCCCTGAAGGATCAGATCTGGTTTTTAATGAAGCTTGCC 1740  
 TTACAAAGGGTCGACCATATACCGGGACTTCCTAGTCTAGACCAAATTAATTCTGAACGG  
 561 N V S Q L V Y G P E G S D L V L M K L A 580  
 1741 AGGCCTGCTGTCCTGGATGATTTTGTAGTACGATTGATTTACCTAATTATGGATGCACA 1800  
 TCCGGACGACAGGACCTACTAAAACAATCATGCTAACTAATGGATTAATACCTACGTGT  
 581 R P A V L D D F V S T I D L P N Y G C T 600

Il Mandatario (continua)  
 (Minoja Fabrizio)  
 di Bianchetti · Bracco · Minoja s.r.l.

*F. Minoja*



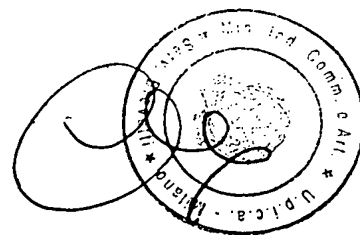
M 25.05.99  
MI.98.A 0179

(Fig. 1a continua)

1801	ATTCCTGAAAAGACCAGTTGCAGTGTTTATGGCTGGGGCTACACTGGATTGATCAACTAT	1860
	TAAGGACTTTTCTGGTCAACGTCACAAATACCGACCCCGATGTGACCTAACTAGTTGATA	
601	I P E K T S C S V Y G W G Y T G L I N Y	620
1861	GATGGCCTATTACGAGTGGCACATCTCTATATAATGGGAAATGAGAAATGCAGCCAGCAT	1920
	CTACCGGATAATGCTCACC GTG TAGAGATATATTACCCTTTACTCTTTACGTCGGTCGTA	
621	D G L L R V A H L Y I M G N E K C S Q H	640
1921	CATCGAGGGAAGGTGACTCTGAATGAGTCTGAAATATGTGCTGGGGCTGAAAAGATTGGA	1980
	GTAGCTCCCTTCCACTGAGACTTACTCAGACTTTATACACGACCCCGACTTTTCTAACCT	
641	H R G K V T L N E S E I C A G A E K I G	660
1981	TCAGGACCATGTGAGGGGGATTATGGTGGCCCACTTGTTTGTGAGCAACATAAAATGAGA	2040
	AGTCCTGGTACACTCCCCCTAATACCACCGGGTGAACAAACACTCGTTGTATTTTACTCT	
661	S G P C E G D Y G G P L V C E Q H K M R	680
2041	ATGGTTCTTGGTGTGTCATTGTTTCTGGTGGTGGATGTGCCATTCCAAATCGTCCTGGTATT	2100
	TACCAAGAACCACAGTAACAAGGACCAGCACCTACACGGTAAGGTTTAGCAGGACCATAA	
681	M V L G V I V P G R G C A I P N R P G I	700
2101	TTTGTCCGAGTAGCATATTATGCAAAATGGATACACAAAATTATTTTAACATATAAGGTA	2160
	AAACAGGCTCATCGTATAATACGTTTTACCTATGTGTTTTAATAAAATTGTATATTCCAT	
701	F V R V A Y Y A K W I H K I I L T Y K V	720
2161	CCACAGTCATAG	2172
	GGTGTGAGTATC	
721	P Q S *	723

Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti - Bracco - Minoja s.r.l.

*F. Minoja*



M 25.05.99  
MI 98 A 0179

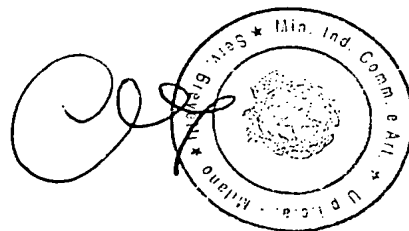
FIGURA 1b

1	ATGGGGTGGCTCCCACTCCTGCTGCTTCTGACTCAATGCTTAGGGGTCCCTGGGCAGCGC	60
	TACCCACCGAGGGTGAGGACGACGAAGACTGAGTTACGAATCCCCAGGGACCCGTCGCG	
1	M G W L P L L L L L T Q C L G V P G Q R	20
61	TCGCCATTGAATGACTTCCAAGTGCTCCGGGGCACAGAGCTACAGCACCTGCTACATGCG	120
	AGCGGTAACCTTACTGAAGGTTACAGAGGCCCGTGTCTCGATGTCGTGGACGATGTACGC	
21	S P L N D F Q V L R G T E L Q H L L H A	40
121	GTGGTGCCCGGGCCTTGGCAGGAGGATGTGGCAGATGCTGAAGAGTGTGCTGGTTCGCTGT	180
	CACCACGGGCGCGGAACCGTCCTCCTACACCGTCTACGACTTCTCACACGACCAGCGACA	
41	V V P G P W Q E D V A D A E E C A G R C	60
181	GGGCCCTTAATGGACTGCCGGGCCTTCCACTACAACGTGAGCAGCCATGGTTGCCAACTG	240
	CCCGGGAATTACCTGACGGCCCGGAAGGTGATGTTGCACTCGTCGGTACCAACGGTTGAC	
61	G P L M D C R A F H Y N V S S H G C Q L	80
241	CTGCCATGGACTCAACACTCGCCCCACACGAGGCTGCGGCGTTCTGGGCGCTGTGACCTC	300
	GACGGTACCTGAGTTGTGAGCGGGGTGTGCTCCGACGCCGCAAGACCCGCGACACTGGAG	
81	L P W T Q H S P H T R L R R S G R C D L	100
301	TTCCAGAAGAAAGACTACGTACGGACCTGCATCATGAACAATGGGGTTGGGTACCGGGGC	360
	AAGGTCTTCTTTCTGATGCATGCCTGGACGTAGTACTTGTTACCCCAACCCATGGCCCCG	
101	F Q K K D Y V R T C I M N N G V G Y R G	120
361	ACCATGGCCACGACCGTGGGTGGCCTGCCCTGCCAGGCTTGGAGCCACAAGTCCCGAAT	420
	TGGTACCGGTGCTGGCACCCACCGGACGGGACGGTCCGAACCTCGGTGTTCAAGGGCTTA	
121	T M A T T V G G L P C Q A W S H K F P N	140
421	GATCACAAGTACACGCCCCACTCTCCGGAATGGCCTGGAAGAGAACTTCTGCCGTAACCTT	480
	CTAGTGTTTCATGTGCGGGTGAGAGGCCTTACCGACCTTCTCTTGAAGACGGCATTGGGA	
141	D H K Y T P T L R N G L E E N F C R N P	160

(continua)

Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti · Bracco · Minoja s.r.l.

*F. Minoja*



(Fig. 1b continua)

MI 98 A 01 7.9

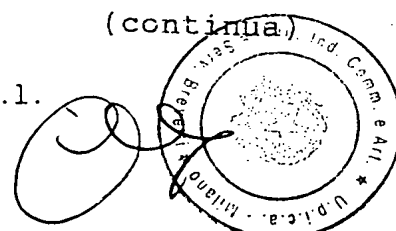
481 GATGGCGACCCCGGAGGTCCTTGGTGCTACACAACAGACCCTGCTGTGCGCTTCCAGAGC 540  
CTACCGCTGGGGCCTCCAGGAACCACGATGTGTTGTCTGGGACGACACGCGAAGGTCTCG  
161 D G D P G G P W C Y T T D P A V R F Q S 180  
531 TGCGGCATCAAATCCTGCCGGGAGGCCGCGTGTGTCTGGTGCAATGGCGAGGAATACCGC 600  
ACGCGGTAGTTTATAGGACGGCCCTCCGGCGCACACAGACCACGTTACCGCTCCTTATGGCG  
181 C G I K S C R E A A C V W C N G E E Y R 200  
601 GGCGCGGTAGACCGCACGGAGTCAGGGCGCGAGTGCCAGCGCTGGGATCTTCAGCACCCG 660  
CCGCGCCATCTGGCGTGCCTCAGTCCCCGCGCTCACGGTCGCGACCCTAGAAGTCGTGGGC  
201 G A V D R T E S G R E C Q R W D L Q H P 220  
661 CACCAGCACCCCTTCGAGCCGGGCAAGTTCCTCGACCAAGGTCTGGACGACAACCTATTGC 720  
GTGGTCGTGGGGAAGCTCGGCCCGTTCAAGGAGCTGGTTCCAGACCTGCTGTTGATAACG  
221 H Q H P F E P G K F L D Q G L D D N Y C 240  
721 CGGAATCCTGACGGCTCCGAGCGGCCATGGTGCTACACTACGGATCCGCAGATCGAGCGA 780  
GCCTTAGGACTGCCGAGGCTCGCCGGTACCACGATGTGATGCCTAGGCGTCTAGCTCGCT  
241 R N P D G S E R P W C Y T T D P Q I E R 260  
781 GAGTTCGTGACCTCCCCCGCTGCGGGTCCGAGGCACAGCCCCGCCAAGAGGCCACAAC 840  
CTCAAGACACTGGAGGGGGCGACGCCAGGCTCCGTGTGCGGGCGGTTCTCCGGTGTGA  
261 E F C D L P R C G S E A Q P R Q E A T T 280  
841 GTCAGCTGCTTCCGCGGGAAGGGTGAGGGCTACCGGGGCACAGCCAATACCACCACTGCG 900  
CAGTCGACGAAGGCGCCCTTCCCACTCCCGATGGCCCCGTGTCGGTTATGGTGGTGACGC  
281 V S C F R G K G E G Y R G T A N T T T A 300  
901 GGCGTACCTTGCCAGCGTTGGGACGCGCAAATCCCGCATCAGCACCGATTACGCCAGAA 960  
CCGCATGGAACGGTCGCAACCCTGCGCGTTTAGGGCGTAGTCGTGGCTAAATGCGGTCTT  
301 G V P C Q R W D A Q I P H Q H R F T P E 320  
961 AAATACGCGTGCAAAGACCTTCGGGAGAACTTCTGCCGGAACCCCGACGGCTCAGAGGCG 1020  
TTTATGCGCACGTTTCTGGAAGCCCTCTTGAAGACGGCCTTGGGGCTGCCGAGTCTCCGC  
321 K Y A C K D L R E N F C R N P D G S E A 340  
1021 CCCTGGTGCTTCACACTGCGGCCCGGCATGCGCGCGGCCTTTTGCTACCAGATCCGGCGT 1080  
GGGACCACGAAGTGTGACGCGGGCCGTACGCGCGCCGAAACGATGGTCTAGGCCGCA  
341 P W C F T L R P G M R A A F C Y Q I R R 360  
1081 TGTACAGACGACGTGCGGCCCCAGGACTGCTACCACGGCGCAGGGGAGCAGTACCGCGGC 1140  
ACATGTCTGCTGCACGCGGGGCTCTGACGATGGTGCCGCGTCCCCTCGTCATGGCGCCG  
361 C T D D V R P Q D C Y H G A G E Q Y R G 380



Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti · Bracco · Minoja s.r.l.

(continua)

*Furuz*





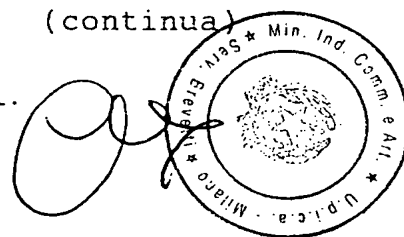
(Fig. 1b continua)

1141 ACGGTCAGCAAGACCCGCAAGGGTGTCCAGTGCCAGCGCTGGTCCGCTGAGACGCCGCAC 1200  
 TGCCAGTCGTTCTGGGCGTTCCACAGGTCACGGTCGCGACCAGGCGACTCTGCGGCGTG  
 381 T V S K T R K G V Q C Q R W S A E T P H 400  
 1201 AAGCCGCGAGTTACGTTTACCTCCGAACCGCATGCACAACCTGGAGGAGAACTTCTGCCGG 1260  
 TTCGGGCGTCAAGTGCAAATGGAGGCTTGGCGTACGTGTTGACCTCCTCTTGAAGACGGCC  
 401 K P Q F T F T S E P H A Q L E E N F C R 420  
 1261 AACCCAGATGGGGATAGCCATGGGGCCCTGGTGCTACACGATGGACCCAAGGACCCCATTC 1320  
 TTGGGTCTACCCCTATCGGTACCCGGGACCACGATGTGCTACCTGGGTTCCTGGGGTAAG  
 421 N P D G D S H G P W C Y T M D P R T P F 440  
 1321 GACTACTGTGCCCTGCGACGCTGCGCTGATGACCAGCCGCCATCAATCCTGGACCCCCCA 1380  
 CTGATGACACGGGACGCTGCGACGCGACTACTGGTCGGCGGTAGTTAGGACCTGGGGGGT  
 441 D Y C A L R R C A D D Q P P S I L D P P 460  
 1381 GACCAGGTGCAGTTTGAGAAGTGTGGCAAGAGGGTGGATCGGCTGGATCAGCGGCGTTCC 1440  
 CTGGTCCACGTCAAACCTCTTACACCGTTCTCCACCTAGCCGACCTAGTCGCCGCAAGG  
 461 D Q V Q F E K C G K R V D R L D Q R R S 480  
 1441 AAGCTGCGCGTGGTTGGGGGCCATCCGGGCAACTCACCTGGACAGTCAGCTTGCGGAAT 1500  
 TTCGACGCGCACCAACCCCGGTAGGCCCGTTGAGTGGGACCTGTCAGTCGAACGCCTTA  
 481 K L R V V G G H P G N S P W T V S L R N 500  
 1501 CGGCAGGGCCAGCATTCTGCGGGGGGTCTCTAGTGAAGGAGCAGTGGATACTGACTGCC 1560  
 GCCGTCCCGGTGCTAAAGACGCCCCCAGAGATCACTTCCTCGTCACCTATGACTGACGG  
 501 R Q G Q H F C G G S L V K E Q W I L T A 520  
 1561 CGGCAGTGCTTCTCCTCCTGCCATATGCCTCTCACGGGCTATGAGGTATGGTTGGGCACC 1620  
 GCCGTACGAAGAGGAGGACGGTATACGGAGAGTGCCCGATACTCCATACCAACCCGTGG  
 521 R Q C F S S C H M P L T G Y E V W L G T 540  
 1621 CTGTTCCAGAACCCACAGCATGGAGAGCCAAGCCTACAGCGGGTCCCAGTAGCCAAGATG 1680  
 GACAAGGTCTTGGGTGTCGTACCTCTCGGTTGCGATGTCGCCCAGGGTCATCGGTTCTAC  
 541 L F Q N P Q H G E P S L Q R V P V A K M 560  
 1681 GTGTGTGGGCCCTCAGGCTCCAGCTTGCTCTGCTCAAGCTGGAGAGATCTGTGACCCTG 1740  
 CACACACCCGGGAGTCCGAGGGTCAACAGGACGAGTTCGACCTCTCTAGACACTGGGAC  
 561 V C G P S G S Q L V L L K L E R S V T L 580  
 1741 AACCAGCGTGTGGCCCTGATCTGCCTGCCCCCTGAATGGTATGTGGTGCCTCCAGGGACC 1800  
 TTGGTTCGACACCCGGGACTAGACGGACGGGGGACTTACCATAACACCGAGGTCCCTGG  
 581 N Q R V A L I C L P P E W Y V V P P G T 600

Il Mandatario  
 (Minoja Fabrizio)  
 di Bianchetti - Bracco - Minoja s.r.l.

Furuz

(continua)



11 25.05.99 MI 8.8 A.017.9

(Fig. 1b continua)

1801	AAGTGTGAGATTGCAGGCTGGGGTGAGACCAAAGGTACGGGTAATGACACAGTCCTAAAT	1860
	TTCACACTCTAACGTCCGACCCCACTCTGGTTTCCATGCCATTACTGTGTCAGGATTTA	
601	K C E I A G W G E T K G T G N D T V L N	620
1861	GTGGCCTTTCTGAATGTTATCTCCAACCAGGAGTGTAAATCAAGCACCGAGGACGTGTG	1920
	CACCGGAAAGACTTACAATAGAGGTTGGTCCTCACATTGTAGTTCGTGGCTCCTGCACAC	
621	V A F L N V I S N Q E C N I K H R G R V	640
1921	CGGGAGAGTGAGATGTGCACTGAGGGACTGTTGGCCCCCTGTGGGGCCTGTGAGGGTGAC	1980
	GCCCTCTCACTCTACACGTGACTCCCTGACAACCGGGGACACCCCGGACACTCCCACTG	
641	R E S E M C T E G L L A P V G A C E G D	660
1981	TACGGGGGGCCCACTTGCTGCTTTACCCACAAGTGTGGGTCCTGGAAGGAATTATAATC	2040
	ATGCCCCCGGGTGAACGGACGAAATGGGTGTTGACGACCCAGGACCTTCCTTAATATTAG	
661	Y G G P L A C F T H N C W V L E G I I I	680
2041	CCCAACCGAGTATGCGCAAGGTCCCGCTGGCCAGCTGTCTTCACGCGTGTCTGTGTTT	2100
	GGGTTGGCTCATACGCGTTCCAGGGCGACCGGTGACAGAAGTGCGCACAGAGACACAAA	
681	P N R V C A R S R W P A V F T R V S V F	700
2101	GTGGACTGGATTACACAAGGTCATGAGACTGGGTTAG	2136
	CACCTGACCTAAGTGTTCAGTACTCTGACCCAATC	
701	V D W I H K V M R L G *	711

Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti - Bracco - Minoja s.r.l.

*Filippo*

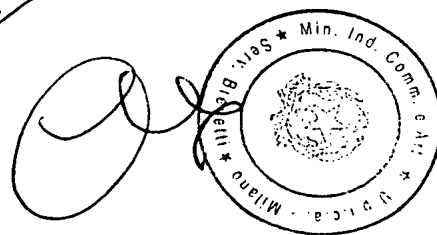
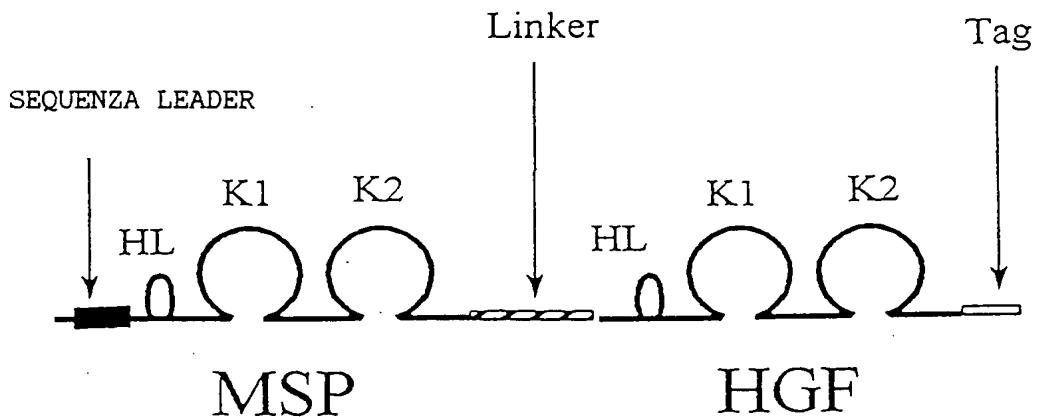
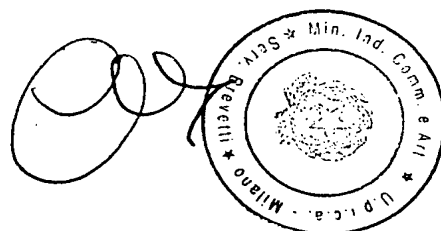


FIGURA 2a



Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti · Bracco · Minoja s.r.l.

*F. Minoja*



MI 08 A.0179

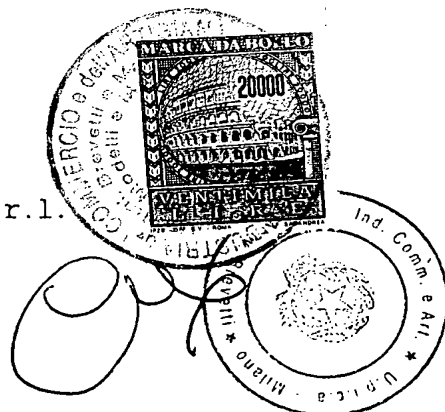
# FIGURA 2b

1 GAATTCCACCATGGGGTGGCTCCCACTCCTGCTGCTTCTGACTCAATGCTTAGGGGTCCC 60  
 CTTAAGGTGGTACCCACCGAGGGTGAAGGACGACGAAGACTGAGTTACGAATCCCCAGGG  
 1 M G W L P L L L L L T Q C L G V P 17  
 61 TGGGCAGCGCTCGCCATTGAATGACTTCCAAGTGTCTCCGGGGCACAGAGCTACAGCACCT 120  
 ACCCGTCGCGAGCGGTAACCTTACTGAAGGTTACAGAGGCCCGTGTCTCGATGTCTGTGGA  
 18 G Q R S P L N D F Q V L R G T E L Q H L 37  
 121 GCTACATGCGGTGGTGGCCGGGCCTTGGCAGGAGGATGTGGCAGATGCTGAAGAGTGTGC 180  
 CGATGTACGCCACCACGGGCGGGAACCGTCCTCCTACACCGTCTACGACTTCTCACAGG  
 38 L H A V V P G P W Q E D V A D A E E C A 57  
 181 TGGTCGCTGTGGGGCCCTTAATGGACTGCCGGGCCTTCCACTACAACGTGAGCAGCCATGG 240  
 ACCAGCGACACCCGGGAATTACCTGACGGCCCGGAAGGTGATGTTGCACTCGTCGGTACC  
 58 G R C G P L M D C R A F H Y N V S S H G 77  
 241 TTGCCAACTGCTGCCATGGACTCAACACTCGCCCCACACGAGGCTGCGGCGTTCTGGGCG 300  
 AACGGTTGACGACGGTACCTGAGTTGTGAGCGGGGTGTGCTCCGACGCCGCAAGACCCGC  
 78 C Q L L P W T Q H S P H T R L R R S G R 97  
 301 CTGTGACCTCTTCCAGAAGAAAGACTACGTACGGACCTGCATCATGAACAATGGGGTTGG 360  
 GACACTGGAGAAGGTCTTCTTTCTGATGCATGCCTGGACGTAGTACTTGTACCCCAACC  
 98 C D L F Q K K D Y V R T C I M N N G V G 117  
 361 GTACCGGGGCACCATGGCCACGACCGTGGGTGGCCTGCCCTGCCAGGCTTGGAGCCACAA 420  
 CATGGCCCCGTGGTACCGGTGCTGGCACCCACCGGACGGGACGGTCCGAACCTCGGTGTT  
 118 Y R G T M A T T V G G L P C Q A W S H K 137  
 421 GTTCCCGAATGATCACAAGTACACGCCCCACTCTCCGGAATGGCCTGGAAGAGAACTTCTG 480  
 CAAGGGCTTACTAGTGTTTCATGTGCGGGTGAGAGGCCTTACCGGACCTTCTCTTGAAGAC  
 138 F P N D H K Y T P T L R N G L E E N F C 157  
 481 CCGTAACCCTGATGGCGACCCCGGAGGTCCTTGGTGCTACACAACAGACCCTGCTGTGCG 540  
 GGCATTGGGACTACCGCTGGGGCCTCCAGGAACCACGATGTGTTGTCTGGGACGACACGC  
 158 R N P D G D P G G P W C Y T T D P A V R 177

(continua)

Il Mandatario  
 (Minoja Fabrizio)  
 di Bianchetti · Bracco · Minoja s.r.l.

*Fabrizio*



M 25 98 A 01 79

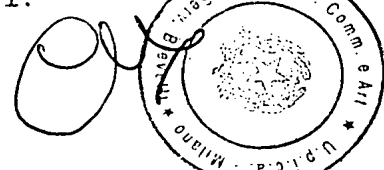
(Fig. 2b continua)

541 CTTCCAGAGCTGCGGCATCAAATCCTGCCGGGAGGCCGCGTGTGTCTGGTGCAATGGCGA 600  
 GAAGGTCTCGACGCCGTAGTTTAGGACGGCCCTCCGGCGCACACAGACCACGTTACCGCT  
 178 F Q S C G I K S C R E A A C V W C N G E 197  
 601 GGAATACCGCGGCGCGGTAGACCGCACGGAGTCAGGGCGCGAGTGCCAGCGCTGGGATCT 660  
 CCTTATGGCGCCGCGCCATCTGGCGTGCCTCAGTCCCGCGCTCACGGTCGCGACCCTAGA  
 198 E Y R G A V D R T E S G R E C Q R W D L 217  
 661 TCAGCACCCGACACCAGCACCCCTTCGAGCCGGGCAAGTTCCTCGACCAAGGTCTGGACGA 720  
 AGTCGTGGGCGTGGTCTGTGGGAAGCTCGGCCCGTTCAAGGAGCTGGTTCAGACCTGCT  
 218 Q H P H Q H P F E P G K F L D Q G L D D 237  
 721 CAACTATTGCCGAATCCTGACGGCTCCGAGCGGCCATGGTGCTACACTACGGATCCGCA 780  
 GTTGATAACGGCCTTAGGACTGCCGAGGCTCGCCGGTACCACGATGTGATGCCTAGGCGT  
 238 N Y C R N P D G S E R P W C Y T T D P Q 257  
 781 GATCGAGCGAGAGTTCTGTGACCTCCCCCGCTGCGGGTCCGAGGCACAGCCCCGCTCGA 840  
 CTAGCTCGCTCTCAAGACACTGGAGGGGCGACGCCAGGCTCCGTGTCGGGGCGGAGCT  
 258 I E R E F C D L P R C G S E A Q P R L E 277  
 841 GGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGCGGTTCTCTAGAGGGACAAAG 900  
 CCCGCCACCGCCAAGACCACCGCCACCGAGGCCGCCACCGCCAAGAGATCTCCCTGTTTC  
 278 G G G G S G G G G S G G G G S L E G Q R 297  
 901 GAAAAGAAGAAATACAATTCATGAATTCAAAAAATCAGCAAAGACTACCCTAATCAAAAT 960  
 CTTTTCTTCTTTATGTTAAGTACTTAAGTTTTTTAGTCGTTTCTGATGGGATTAGTTTTA  
 298 K R R N T I H E F K K S A K T T L I K I 317  
 961 AGATCCAGCACTGAAGATAAAAACCAAAAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCTAATAG 1020  
 TCTAGGTGCTGACTTCTATTTTTGGTTTTTTCACTTATGACGTCTGGTTACACGATTATC  
 318 D P A L K I K T K K V N T A D Q C A N R 337  
 1021 ATGTACTAGGAATAAAGGACTTCCATTCACTTGCAAGGCTTTTGTGTTTTGATAAAGCAAG 1080  
 TACATGATCCTTATTTCTGAAGGTAAGTGAACGTTCCGAAAACAAAACTATTTTCGTTT  
 338 C T R N K G L P F T C K A F V F D K A R 357  
 1081 AAAACAATGCCTCTGGTTCCCCTTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAGAATTTGG 1140  
 TTTTGTACGGAGACCAAGGGGAAGTTATCGTACAGTTCACCTCACTTTTTTCTTAAACC  
 358 K Q C L W F P F N S M S S G V K K E F G 377  
 1141 CCATGAATTTGACCTCTATGAAAACAAAGACTACATTAGAAACTGCATCATTGGTAAAGG 1200  
 GGTACTTAAACTGGAGATACTTTTGTCTGATGTAATCTTTGACGTAGTAACCATTTC  
 378 H E F D L Y E N K D Y I R N C I I G K G 397

Il Mandatario  
 (Minoja Fabrizio)  
 di Bianchetti - Bracco - Minoja s.r.l.

(continua)

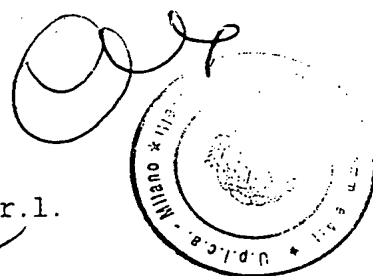
*F. Minoja*



MI 98 A 0179

[illegible]

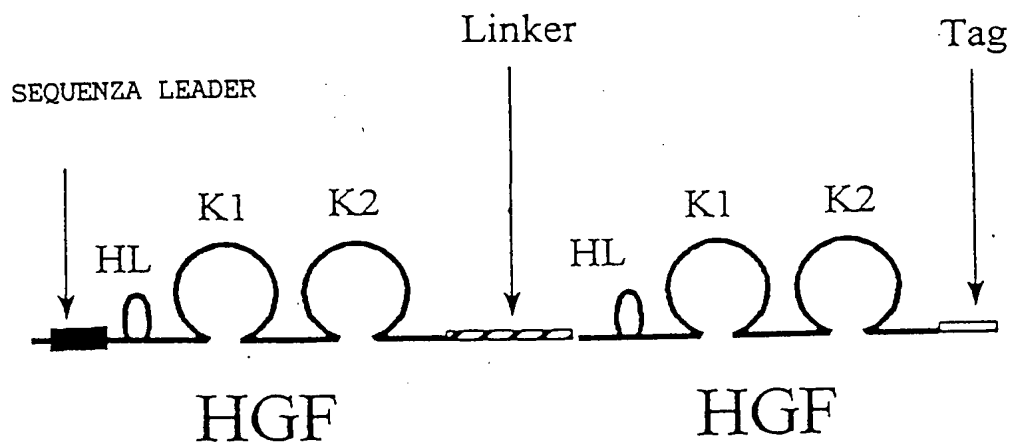
Funny



M 26.05.99

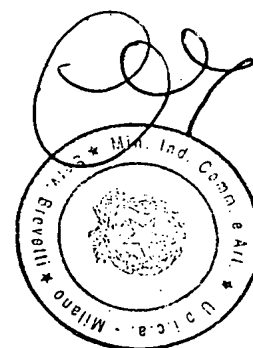
MI 98 A 0179

FIG. 3a



Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti · Bracco · Minoja s.r.l.

*Fabrizio*



M 25.05.99  
MI-98 A 0179

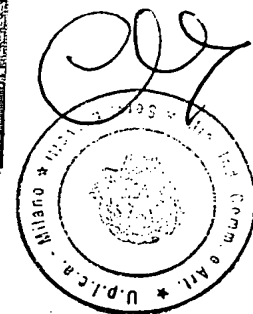
FIGURA 3b

1 GGATCCGCCAGCCCGTCCAGCAGCACCATGTGGGTGACCAAACTCCTGCCAGCCCTGCTG 60  
CCTAGGCGGTTCGGGCAGGTCTGCTGGTACACCCACTGGTTTGAGGACGGTCGGGACGAC  
1 M W V T K L L P A L L 11  
61 CTGCAGCATGTCCTCCTGCATCTCCTCCTGCTCCCCATCGCCATCCCCTATGCAGAGGGA 120  
GACGTCGTACAGGAGGACGTAGAGGAGGACGAGGGGTAGCGGTAGGGGATACGTCTCCCT  
12 L Q H V L L H L L L P I A I P Y A E G 31  
121 CAAAGGAAAAGAAGAAATACAATTTCATGAATTCAAAAAATCAGCAAAGACTACCCTAATC 180  
GTTTCCTTTTCTTTCTTTATGTTAAGTACTTAAGTTTTTTAGTCGTTTCTGATGGGATTAG  
32 Q R K R R N T I H E F K K S A K T T L I 51  
181 AAAATAGATCCAGCACTGAAGATAAAAAACCAAAAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCT 240  
TTTTATCTAGGTCGTGACTTCTATTTTTGGTTTTTTCACTTATGACGTCTGGTTACACGA  
52 K I D P A L K I K T K K V N T A D Q C A 71  
241 AATAGATGTACTAGGAATAAAGGACTTCCATTCACTTGCAAGGCTTTTGTTTTTGATAAA 300  
TTATCTACATGATCCTTATTTCTGAAGGTAAGTGAACGTTCCGAAAACAAAACTATTT  
72 N R C T R N K G L P F T C K A F V F D K 91  
301 GCAAGAAAACAATGCCTCTGGTTCCCTTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAGAA 360  
CGTTCTTTTGTTACGGAGACCAAGGGGAAGTTATCGTACAGTTCACCTCACTTTTTTCTT  
92 A R K Q C L W F P F N S M S S G V K K E 111  
361 TTTGGCCATGAATTTGACCTCTATGAAAACAAAGACTACATTAGAACTGCATCATTGGT 420  
AAACCGGTACTTAACTGGAGATACTTTTGTTTCTGATGTAATCTTTGACGTAGTAACCA  
112 F G H E F D L Y E N K D Y I R N C I I G 131  
421 AAAGGACGCAGCTACAAGGGAACAGTATCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGCCC 480  
TTTCCTGCGTCGATGTTCCCTTGTCATAGATAGTGATTCTCACCGTAGTTTACAGTCGGG  
132 K G R S Y K G T V S I T K S G I K C Q P 151  
481 TGGAGTTCCATGATACCACACGAACACAGCTATCGGGGTAAAGACCTACAGGAAAACTAC 540  
ACCTCAAGGTACTATGGTGTGCTTGTGTCGATAGCCCCATTTCTGGATGTCCTTTTGATG  
152 W S S M I P H E H S Y R G K D L Q E N Y 171

(continua)

Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti · Bracco · Minoja s.r.l.

Furioso





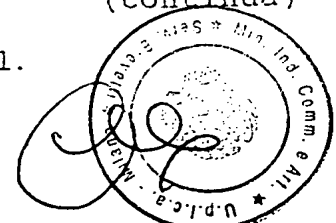
(Fig. 3b continua)

541 TGTCGAAATCCTCGAGGGGAAGAAGGGGGACCCCTGGTGTTCACAAGCAATCCAGAGGTA 600  
ACAGCTTTAGGAGCTCCCCTTCTTCCCCCTGGGACCACAAAGTGTTCGTTAGGTCTCCAT  
172 C R N P R G E E G G P W C F T S N P E V 191  
601 CGCTACGAAGTCTGTGACATTCCTCAGTGTTCAGAAGTTGAATGCATGACCTGCAATGGG 660  
GCGATGCTTCAGACACTGTAAGGAGTCACAAGTCTTCAACTTACGTACTGGACGTTACCC  
192 R Y E V C D I P Q C S E V E C M T C N G 211  
661 GAGAGTTATCGAGGTCTCATGGATCATAACAGAAATCAGGCAAGATTTGTCAGCGCTGGGAT 720  
CTCTCAATAGCTCCAGAGTACCTAGTATGTCTTAGTCCGTTCTAAACAGTCGCGACCCTA  
212 E S Y R G L M D H T E S G K I C Q R W D 231  
721 CATCAGACACCACACCGGCACAAATTCTTGCCTGAAAGATATCCCGACAAGGGCTTTGAT 780  
GTAGTCTGTGGTGTGGCCGTGTTAAGAACGGACTTTCTATAGGGCTGTTCCCGAAACTA  
232 H Q T P H R H K F L P E R Y P D K G F D 251  
781 GATAATTATTGCCGCAATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCATGGTGCTATACTCTTGACCCT 840  
CTATTAATAACGGCGTTAGGGCTACCGGTCGGCTCCGGTACCACGATATGAGAACTGGGA  
252 D N Y C R N P D G Q P R P W C Y T L D P 271  
841 CACACCCGCTGGGAGTACTGTGCAATTAAAACATGCGCTGACAAAGCTTCGGGCGGTGGC 900  
GTGTGGGCGACCCTCATGACACGTTAATTTGTACGCGACTGTTTCGAAGCCCGCCACCG  
272 H T R W E Y C A I K T C A D K A S G G G 291  
901 GGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGCGGTTCTCTAGAGGGACAAAGGAAAAGAAGA 960  
CCAAGACCACCGCCACCGAGGCGCCACCGCCAAGAGATCTCCCTGTTTCTTTCTTCT  
292 G S G G G G S G G G G S L E G Q R K R R 311  
961 AATACAATTTCATGAATTCAAAAAATCAGCAAAGACTACCCTAATCAAATAGATCCAGCA 1020  
TTATGTTAAGTACTTAAGTTTTTTAGTCGTTTCTGATGGGATTAGTTTTATCTAGGTCGT  
312 N T I H E F K K S A K T T L I K I D P A 331  
1021 CTGAAGATAAAAACCAAAAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCTAATAGATGTACTAGG 1080  
GACTTCTATTTTTGGTTTTTTCACTTATGACGTCTGGTTACACGATTATCTACATGATCC  
332 L K I K T K K V N T A D Q C A N R C T R 351  
1081 AATAAAGGACTTCCATTCACTTGCAAGGCTTTTGTTTTTTGATAAAGCAAGAAAACAATGC 1140  
TTATTTCTGAAGGTAAGTGAACGTTCCGAAAACAAAACATTTTCGTTCTTTTGTTACG  
352 N K G L P F T C K A F V F D K A R K Q C 371  
1141 CTCTGGTTCCCCTTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAAAGAATTTGGCCATGAATTT 1200  
GAGACCAAGGGGAAGTTATCGTACAGTTCACCTCACTTTTTTCTTAAACCGGTACTTAA  
372 L W F P F N S M S S G V K K E F G H E F 391

Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti - Bracco - Minoja s.r.l.

*F. Minoja*

(continua)



MI 26.05.99

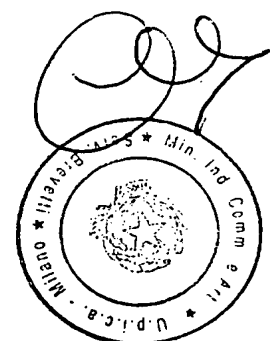
MI 98 A 0179

(Fig. 3b continua)

1201 GACCTCTATGAAAACAAAGACTACATTAGAACTGCATCATTGGTAAAGGACGCAGCTAC 1260  
 CTGGAGATACTTTTGTCTGATGTAATCTTTGACGTAGTAACCATTTCCTGCGTCGATG  
 392 D L Y E N K D Y I R N C I I G K G R S Y 411  
 1261 AAGGGAACAGTATCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGCCCTGGAGTTCCATGATA 1320  
 TTCCCTTGTCATAGATAGTGATTCTCACCCTAGTTTACAGTCGGGACCTCAAGGTACTAT  
 412 K G T V S I T K S G I K C Q P W S S M I 431  
 1321 CCACACGAACACAGCTATCGGGGTAAAGACCTACAGGAAAACCTACTGTGAAATCCTCGA 1380  
 GGTGTGCTTGTGTCGATAGCCCCATTTCTGGATGTCCTTTTGATGACAGCTTTAGGAGCT  
 432 P H E H S Y R G K D L Q E N Y C R N P R 451  
 1381 GGGGAAGAAGGGGACCCTGGTGTTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGAAGTCTGT 1440  
 CCCCTTCTTCCCCCTGGGACCACAAAGTGTTTCGTTAGGTCTCCATGCGATGCTTCAGACA  
 452 G E E G G P W C F T S N P E V R Y E V C 471  
 1441 GACATTCTCAGTGTTTCAAGTTGAATGCATGACCTGCAATGGGGAGAGTTATCGAGGT 1500  
 CTGTAAGGAGTCACAAGTCTTCAACTTACGTACTGGACGTTACCCCTCTCAATAGCTCCA  
 472 D I P Q C S E V E C M T C N G E S Y R G 491  
 1501 CTCATGGATCATAACAGAATCAGGCAAGATTTGTGACGCTGGGATCATCAGACACCACAC 1560  
 GAGTACCTAGTATGTCTTAGTCCGTTCTAAACAGTCGCGACCCTAGTAGTCTGTGGTGTG  
 492 L M D H T E S G K I C Q R W D H Q T P H 511  
 1561 CGGCACAAATTCTTGCTGAAAGATATCCCGACAAGGGCTTTGATGATAATTATTGCCGC 1620  
 GCCGTGTTTAAAGACGGACTTTCTATAGGGCTGTCCCGAACTACTATTAATAACGGCG  
 512 R H K F L P E R Y P D K G F D D N Y C R 531  
 1621 AATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCATGGTGCTATACTCTTGACCCTCACACCCGCTGGGAG 1680  
 TTAGGGCTACCGGTCCGGTCCGGTACCACGATATGAGAACTGGGAGTGTGGGCGACCCCTC  
 532 N P D G Q P R P W C Y T L D P H T R W E 551  
 1681 TACTGTGCAATTAAAACATGCGCTGACAAAGCTGACGACGACGACAAACACCACCACCAC 1740  
 ATGACACGTTAATTTGTACGCGACTGTTTCGACTGCTGCTGCTGTTTGTGGTGGTGGTG  
 552 Y C A I K T C A D K A D D D D K H H H H 571  
 1741 CACCACCACTAGGGTTCGAC 1759  
 GTGGTGGTGTATCCAGCTG  
 572 H H H \* 574

Il Mandatario  
 (Minoja Fabrizio)  
 di Bianchetti - Bracco - Minoja s.r.l.

*F. Minoja*



MI 26.05.99  
MI 98A 0179

FIGURA 4

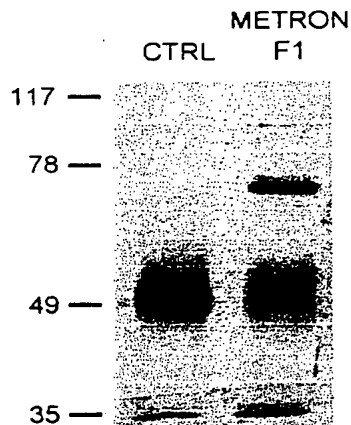
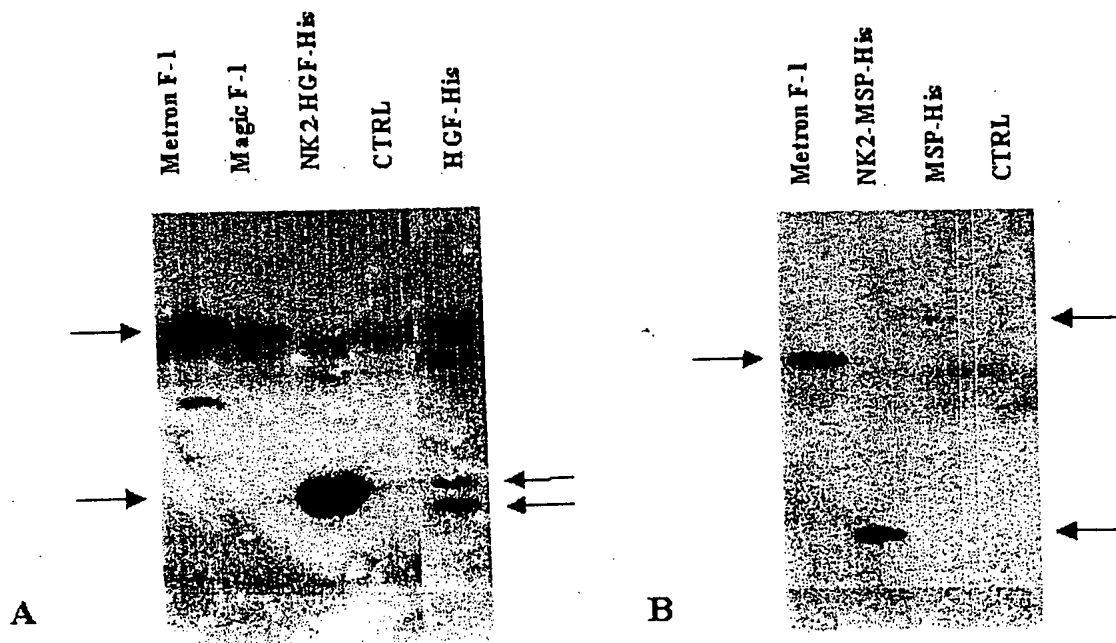
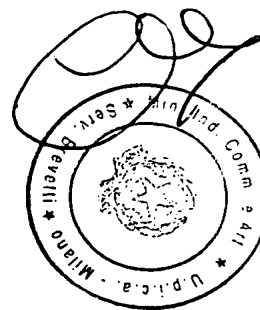


FIGURA 5



Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti - Bracco - Minoja s.r.l.

*Fabrizio*



M 26.05.99

MI 98 A 0179

FIGURA 6

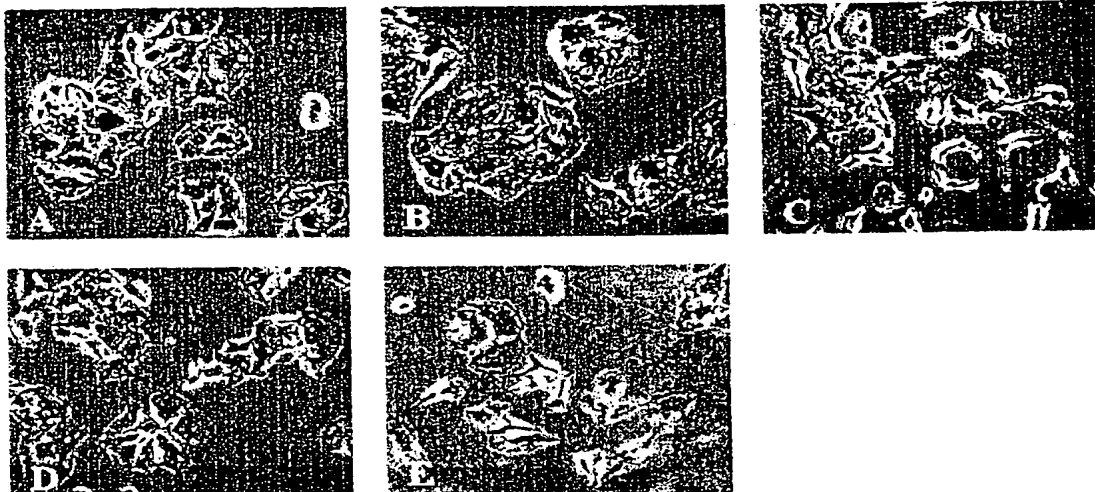
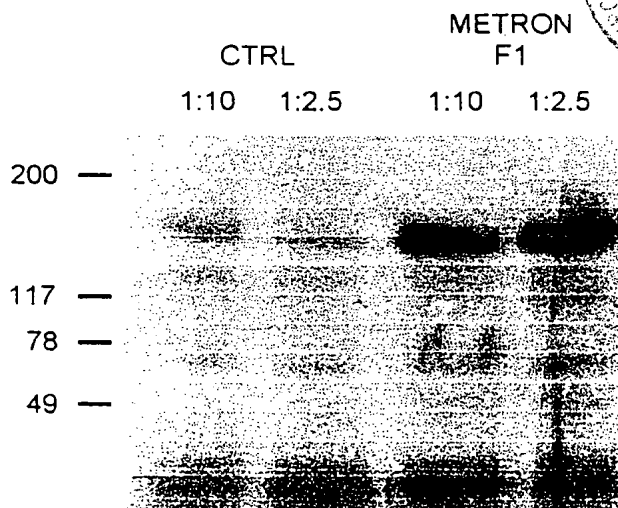


FIGURA 7



Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.

*F. Minoja*

